



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**“CARACTERIZACION MOLECULAR DE CINCO POBLACIONES DE MAPEO F<sub>2</sub> EN  
GIRASOL CULTIVADO (*HELIANTHUS ANNUUS* VAR. *MACROCARPUS* (DC) COCKERELL)  
SEGREGANTES PARA TOLERANCIA A ESTRES HIDRICO MEDIANTE MARCADORES  
MICROSATELITES”**

**Lic. NANCY GABRIELA GRANDON**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE MAGISTER EN GENETICA VEGETAL**

**DIRECTOR: Dra. MARIA VALERIA MORENO**

**CO- DIRECTOR: Dra. EUGENIA ALEJANDRA MARTIN**

**2018**

**“CARACTERIZACION MOLECULAR DE CINCO POBLACIONES DE MAPEO F<sub>2</sub> EN  
GIRASOL CULTIVADO (*HELIANTHUS ANNUUS* VAR. *MACROCARPUS* (DC) COCKERELL)  
SEGREGANTES PARA TOLERANCIA A ESTRES HIDRICO MEDIANTE MARCADORES  
MICROSATELITES”**

NANCY GABRIELA GRANDON

Licenciada en Genética – Universidad Nacional de Misiones

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Grupo de Biotecnología en Cultivos de INTA-EEA Manfredi, durante el período comprendido entre enero de 2015 y noviembre de 2017, bajo la dirección de la Dra. María Valeria Moreno y la codirección de la Dra. Eugenia Alejandra Martin.

Nombre y firma del Maestrando: Nancy Gabriela Grandón

Nombre y firma del Director: María Valeria Moreno

Nombre y firma del Co – Director: Eugenia Alejandra Martin

Defendida: .....de 20\_\_.

## AGRADECIMIENTOS

A mis papás (Tere y Mario) y a mis amigas (todas ellas) por el apoyo emocional e incondicional, porque sin ellos hoy no estaría acá.

A mi hermano (el Chiche), por la paciencia para enseñarme álgebra.

A Mauricio, por la tolerancia, por el amor que me da y también, por acompañarme algún sábado o domingo a pesar macetas.

A Emanuel Cicconi, por su orientación técnica y académica en el desarrollo del ensayo y en la discusión de los resultados, además de estar atento a mis preguntas sin importar la hora o el día.

A Carolina Díaz, por el asesoramiento estadístico y la buena onda para responder a mis dudas.

A Valeria Moreno y Eugenia Martin por aceptar dirigirme y por la asistencia académica durante el desarrollo de la tesis. En especial a Valeria, por ayudarme en el registro de los datos mientras esperaba el nacimiento de Nachito.

A Eva Mamani, por ayudarme con el diseño experimental del ensayo y por acompañarme varios fines de semana a pesar y regar macetas.

A Gaspar Yachetta, Maximiliano Casalanguida y Luis Mecchia, por el compromiso en el desarrollo del ensayo y por la predisposición para levantarse temprano y viajar al INTA un día sábado.

Al Ing. Agr. Daniel Álvarez y al Grupo de Mejoramiento de Girasol, por disponibilizar y generar las líneas y las poblaciones  $F_2$  evaluadas en la tesis, además de colaborar en el ensayo.

A la Ing. Agr. Claudia Vega, por su asesoramiento académico.

A Silvana Miravet por la ayuda en la búsqueda bibliográfica.

A Valeria Arolfo por prestarme la computadora y por la corrección del *Abstract*.

A los profesores de la Maestría en Genética Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, por mi formación académica.

Al INTA por contribuir con los recursos necesarios para mi formación.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Teresa Martín y Mario Grandón, por su esfuerzo e incentivo para que viniera a Córdoba y por darme la posibilidad de estudiar y desarrollarme como profesional.

### **Publicaciones y Presentaciones a Congresos:**

Grandón N.G., Moreno M.V, Mecchia L., Martin E.A. (2018). *Selección de una población de mapeo para la tolerancia al estrés hídrico en girasol (Helianthus annuus var. macrocarpus (DC) Cockerell)*. En: III Jornadas Regionales de Genética del Litoral. 28 y 29 de junio de 2018. INTA-EEA Rafaela, Santa Fe (AR).

Grandon N., Martin E., Cicconi E., Díaz C., Mamaní E., Yachetta G., Casalanguida M., Mecchia L., Moreno M.V. (2018). *Drought tolerance phenotyping in sunflower inbreed lines (Helianthus annuus var. macrocarpus (DC) Cockerell)*. En: XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal - XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. 11 al 15 de noviembre de 2018. Córdoba (AR).

## INDICE

<b>1.</b>	<b>ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>4.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>14</b>
4.1.	Origen y dispersión del girasol	14
4.2.	Importancia económica del cultivo y su producción en la Argentina	15
4.3.	Información nutricional	16
4.4.	Descripción botánica	17
4.5.	Ciclo ontogénico	20
4.6.	Efectos del estrés hídrico y mecanismos fisiológicos de adaptación y tolerancia al mismo	21
4.7.	Mejoramiento de girasol en Argentina	23
4.8.	Mejoramiento asistido por marcadores	24
4.9.	Mapeo genético	25
4.10.	Efectos de la distorsión en el mapeo genético	26
4.11.	Importancia para el programa de mejoramiento del INTA	28
<b>5.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>29</b>
<b>6.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
6.1.	Objetivo general	29
6.2.	Objetivos específicos	29
<b>7.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>30</b>
7.1.	Caracterización fenotípica de las líneas parentales	30
7.1.1.	<i>Material vegetal</i>	30
7.1.2.	<i>Diseño experimental</i>	31
7.1.3.	<i>Determinación de variables agronómicas y climáticas</i>	32
7.1.4.	<i>Análisis estadístico</i>	36
7.2.	Caracterización genotípica de las líneas parentales	36
7.2.1.	<i>Extracción de ADN</i>	36
7.2.2.	<i>Amplificación por PCR</i>	36
7.2.3.	<i>Genotipificación en geles de poliacrilamida</i>	37
7.2.4.	<i>Análisis de diversidad de marcadores</i>	37

7.2.5.	<i>Análisis de conglomerados</i> .....	38
7.3.	Caracterización genotípica de las poblaciones F <sub>2</sub> .....	38
7.4.	Análisis de segregación de marcadores microsatélites en las poblaciones F <sub>2</sub> segregantes .....	39
7.5.	Selección de una población F <sub>2</sub> segregante apta para el desarrollo de un mapa de ligamiento de marcadores.....	40
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	41
8.1.	Caracterización fenotípica de las líneas parentales.....	41
8.2.	Caracterización genotípica de las líneas parentales.....	53
8.3.	Caracterización genotípica de las poblaciones F <sub>2</sub> y análisis de segregación de marcadores.....	56
8.4.	Selección de una población F <sub>2</sub> segregante apta para el desarrollo de un mapa de ligamiento de marcadores.....	59
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	61
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	74
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	74
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	75
<b>13.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	88

## 1. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

$\alpha$	alfa.
$\beta$	beta.
$\gamma$	gama.
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados.
$\psi_a$	potencial hídrico o potencial agua.
$\psi_t$	potencial de turgencia.
$\psi_s$	potencial osmótico o soluto.
$\psi_{\text{suelo}}$	potencial hídrico del suelo.
$\mu\text{L}$	microlitro.
$\mu\text{M}$	micromolar.
$\text{MgCl}_2$	cloruro de magnesio.
$\chi^2$	chi-cuadrado.
ACP	análisis de componentes principales.
ADN	ácido desoxirribonucleico.
AF	área foliar.
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism.</i>
AGI	ácidos grasos insaturados.
AGS	ácidos grasos saturados.
AOI	ácido oleico.
AOs	ajuste osmótico.
BAG-IM	Banco Activo de Germoplasma de INTA Manfredi.
BC	<i>Backcross.</i>
CC	capacidad de campo.
cm	centímetro.
CTAB	<i>Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide.</i>
D	Índice de diversidad genética.
DH	doble haploide.
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato.
DPV	déficit de presión de vapor.
EDTA	<i>Ethylene-diamine-tetraacetic acid.</i>
EH	estrés hídrico.
EST-SSR	<i>Expressed Sequence Tags- Simple Sequence Repeats.</i>



ET	eficiencia transpiratoria.
EUA	eficiencia en el uso del agua.
F <sub>2</sub>	filial 2.
g	gramos.
GAF	ganancia de área foliar.
Gb	gigabases.
GL	grupo de ligamiento.
gSSR	<i>genomic Simple Sequence Repeats.</i>
GxT	genotipo por tratamiento.
h	hora.
Ha	hectárea.
He	heterocigosidad esperada o insesgada de Nei.
Hg	humedad gravimétrica.
HR	humedad relativa.
Kg	kilogramo.
kPa	kilopascal.
K	conductancia hidráulica.
LDS	<i>loci</i> de distorsión de la segregación.
m	metro.
mL	mililitro.
min	minuto.
mm	milímetro.
mM	milimolar.
M	molar.
MAS	<i>Marker-Assisted Selection</i>
MHa	millones de hectáreas.
MPa	megapascal.
MTn	millones de toneladas.
Na	número de alelos por <i>locus</i> .
Ne	número efectivo de alelos por <i>locus</i> .
ng	nanogramos.
pb	pares de bases.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction.</i>

PGR	porcentaje de germinación relativo.
pH	potencial hidrógeno.
PIC	contenido de información polimórfica.
PMP	punto de marchitez permanente.
p/v	peso/volumen.
QTLs	<i>Quantitative Trait Loci.</i>
R	estadio reproductivo.
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNAs.</i>
RDS	regiones de distorsión de la segregación.
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism.</i>
RILs	<i>Recombinant Inbred Lines.</i>
RNAse	Ribonucleasa.
rpm	revoluciones por minuto.
s	segundo.
s.f.	sin fecha.
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms.</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats.</i>
TAE	Tris Acetato EDTA.
TAN	tasa de asimilación neta.
TBE	Tris Borato EDTA.
TE	Tris EDTA.
Tn	toneladas.
TRAP	<i>Target Region Amplification Polymorphism.</i>
TT	tasa transpiratoria.
TT <sub>máx</sub>	tasa transpiratoria máxima.
U	unidades.
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average.</i>
V	voltios.
V	estadio vegetativo.
VE	vegetativo-emergencia.
vol	volumen.
W	watts.

## 2. RESUMEN

Argentina es el cuarto productor de aceite de girasol (*Helianthus annuus* var. *macrocarpus* (DC) Cockerell) a nivel mundial. Sin embargo, debido al creciente desarrollo de los cultivos extensivos, el desplazamiento del cultivo hacia zonas marginales con déficit hídrico acentuado provocó pérdidas significativas en el rendimiento. Por consiguiente, resulta interesante identificar las regiones genómicas asociadas a la tolerancia al estrés hídrico para utilizarlas en la implementación de Selección Asistida por Marcadores (MAS) en este cultivo. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar una población de mapeo  $F_2$  adecuada para el desarrollo de un mapa de ligamiento mediante el análisis molecular con marcadores microsatélites (SSR) y la caracterización fenotípica de las líneas parentales frente al estrés hídrico. Se evaluaron siete líneas endocriadas (B59, HA64, HA89, HAR4, R419, R423 y R432) mediante un ensayo en invernáculo durante el período vegetativo y bajo dos tratamientos: control a capacidad de campo (CC) y estresado (EH: 70% de CC). Las variables analizadas fueron: ganancia de área foliar (GAF), transpiración total acumulada (Tta), tasa de asimilación neta (TAN), eficiencia en el uso de agua (EUA) y de la relación tasa transpiratoria (TT) – déficit de presión de vapor (DPV), mediante la determinación de la pendiente y el punto C. Los datos fenotípicos se analizaron mediante un análisis de componentes principales (ACP) y por modelos lineales generalizados mixtos para determinar la existencia de diferencias significativas entre genotipos y entre tratamientos, como así también la interacción genotipo por tratamiento (GxE). Paralelamente, las líneas se caracterizaron con 127 marcadores SSR y se realizó un análisis de conglomerados a partir de la distancia de Nei *Standard*. Cuatro de estas líneas (B59, R419, R423 y R432), caracterizadas previamente en el campo, se utilizaron para generar cinco poblaciones  $F_2$  segregantes, caracterizadas con 34 SSR polimórficos; los cuales fueron seleccionados a partir del análisis genotípico de los parentales a fin de determinar si presentaban segregación mendeliana (1:2:1). A partir de los datos fenotípicos se detectaron diferencias significativas entre genotipos y entre tratamientos para todas las variables evaluadas, además de interacción significativa GxT para TAN, EUA y el punto C ( $p < 0,05$ ). Bajo estrés se observó una reducción significativa de GAF (18%,  $p = 0,0004$ ) y como consecuencia, una disminución en la Tta (23%,  $p < 0,0001$ ), lo cual quedó reflejado en la correlación positiva entre ambas variables ( $r = 0,60$ ,  $p < 0,0001$ ). En cuanto a TAN y EUA, el tratamiento EH mostró un aumento significativo con respecto a CC para todos los genotipos analizados ( $p < 0,0001$ ) y una alta correlación positiva entre TAN y EUA ( $r = 0,77$ ,  $p < 0,0001$ ). Por otro lado, bajo estrés todos los genotipos redujeron

tanto la pendiente como el punto C de la relación TT-DPV ( $p < 0,05$ ); alcanzando la  $TT_{\text{máx}}$  a un valor de DPV más bajo y reduciendo así la transpiración. El ACP explicó el 80% de la variabilidad total observada, donde la CP1 separó a HA89 y R419 de los demás genotipos por presentar menor pendiente y mayor punto C en ambos tratamientos. A su vez, las variables con mayor peso para la CP2 (Tta y EUA), discriminaron a los genotipos por tratamiento. Teniendo en cuenta estos resultados se clasificaron a los genotipos como de eficiencia transpiratoria alta (HA64 y HAR4), intermedia (B59, R423 y R432) y baja (HA89 y R419). De los 127 SSR analizados, 94 de ellos detectaron en promedio 54% de polimorfismo entre los parentales e identificaron un total de 262 alelos. A partir del análisis de conglomerados se identificaron dos grupos, uno formado por HAR4 y B59 y el otro que incluyó a los demás genotipos. Dentro de este grupo se formaron dos subgrupos, uno conformado por R423, HA89 y R419 y otro por R432 y HA64. El análisis de segregación de los 34 marcadores analizados en cada población  $F_2$  mostró distorsión en todas ellas, siendo R423xR419 la que presentó el 100% de los marcadores distorsionados con un desvío hacia R423. Sin embargo, las demás poblaciones mostraron un porcentaje variable de distorsión (B59xR432: 9%, B59xR423: 21%, R419xR423: 15% y R419xR432: 15%). En todos los casos, la selección gamética y cigótica estaría causando dicha distorsión. No obstante, el patrón diferencial de segregación observado entre las poblaciones R423xR419 y R419xR423, se debería a un efecto del citoplasma materno. Con base en el análisis fenotípico y molecular de las líneas parentales, así como también en el análisis genotípico de las cinco poblaciones segregantes, se concluye que la población  $F_2$  elegida a fin de ser utilizada en el desarrollo de un mapa de ligamiento en girasol es R419xR432. La misma mostró mayor polimorfismo entre las líneas parentales (64%) y sólo un 15% de distorsión en la segregación de marcadores. Además, sus parentales se ubicaron en subgrupos distintos del dendrograma y mostraron un comportamiento contrastante frente al estrés hídrico.

### 3. ABSTRACT

**“Molecular characterization of five F<sub>2</sub> segregating populations for drought tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* var. *macrocarpus* (DC) Cockerell) by Simple Sequence Repeats (SSR)”**

Sunflower is the second most important sources of vegetable oil in Argentina. The aim of this study was to identify an adequate F<sub>2</sub> segregating population to develop a genetic linkage map. Phenotyping of seven inbred lines (ILs) was conducted in the greenhouse during vegetative stage, under well-watered (WW) and water-deficit (WD) conditions. Traits evaluated were: gain of leaf area (GLA), total water use (TWU), net assimilation rate (NAR), water use efficiency (WUE) and transpiration rate (TR) response to vapor pressure deficit (VPD) (slope and breakpoint). These seven ILs were evaluated with 127 SSR markers and a cluster analyses was conducted. Five F<sub>2</sub> populations were derived from initial crosses between four contrasted ILs previously evaluated in the field (B59, R419, R423 and R432). Each F<sub>2</sub> population was genotyped with 34 SSR previously selected and the marker segregation analysis was conducted. Significant differences between ILs and between treatments were found for all the traits. Significant genotype for treatments interaction was observed for NAR, WUE and breakpoint in the VPD response. Under WD condition, all genotypes showed lower GLA and TWU than WW treatment, whereas NAR and WUE increased their values for WD treatments. All genotypes showed reduction of the slope and breakpoint in high VPD response on the WD treatment. PCA analysis was performed and explains 80% of the total variability. PC1 discriminated HA89 and R419 from the other genotypes due to a lower slope and higher breakpoint, whereas PC2 separated all genotypes by treatment based on WUE and TWU values. Genotyping of ILs was performed and 91 SSR were amplified detecting 262 alleles. Genotyping of F<sub>2</sub> populations showed significant distorted segregation ratios for all populations ( $p < 0.05$ ) and R423xR419 population showed 100% of distortion ratios, whereas the reciprocal population R419xR423 showed only 15% of distorted markers. In conclusion, the most suitable F<sub>2</sub> population to be used is R419xR432, because it showed a low degree of distortion segregation (15%) and their parents presented a high polymorphism level (64%), were located in different genetic clusters and have contrasting response to drought tolerance.

## 4. INTRODUCCION

### 4.1. Origen y dispersión del girasol

El género *Helianthus* abarca 14 especies anuales y 37 especies perennes, y pertenece a la familia de las Asteráceas (Schilling, 2006). Uno de sus representantes cultivados, es el girasol (*Helianthus annuus* ssp. *macrocarpus*) originario de la región centro-este de Estados Unidos, donde las poblaciones indígenas cultivaban las formas silvestres para alimento y extracción de aceite. Dicha especie surgió a partir de *Helianthus annuus* ssp. *annuus* por selección de mutantes menos ramificados y de semillas más grandes. El girasol así domesticado fue llevado a España en 1569, donde se dispersó como planta ornamental (Figura 1). Más tarde, en el siglo XVIII, fue introducido a Rusia donde adquirió importancia como cultivo oleaginoso. En 1880, el cultivo se reintroduce nuevamente en Norteamérica, donde se lo cultiva como silaje para el ganado y semilla para aves de corral (Kugler y Godoy, 1964; Paniego *et al.*, 2007; Seiler y Jan, 2010).



**Figura 1:** Origen y distribución del girasol cultivado. **Fuente:** Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR).

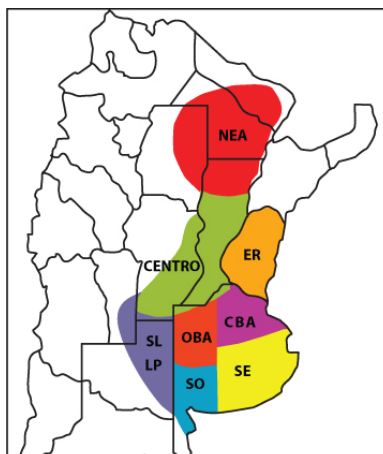
En Argentina, en el siglo XIX, los colonos hebreos introducen el girasol para consumo propio. A partir de 1900 comienza su distribución por agricultores para consumo familiar y entre 1930 y 1959 se produce su expansión como cultivo oleaginoso, posicionando a la Argentina como primer productor mundial de semilla de girasol. Entre 1950 y 1960 ocurre una etapa de crisis sanitaria que fue superada por el aporte del mejoramiento genético, dando como resultado la recuperación del cultivo. Así, en 1960 el INTA obtiene la primera variedad “Manfredi INTA” resistente a roya, pero su falta de uniformidad y facilidad de desgrane limitaron su difusión. No obstante, a partir de 1975 con el descubrimiento de la androsterilidad genética y citoplasmática por Leclercq (1966), se produjo un gran desarrollo de híbridos comerciales con alto rendimiento, resistencia a enfermedades y alto contenido de aceite (ASAGIR, s.f.).

#### 4.2. Importancia económica del cultivo y su producción en la Argentina

El girasol es uno de los cultivos oleaginosos más importantes a nivel mundial, ya que su aceite ocupa el cuarto lugar después de la palma (*Elaeis guineensis* Jacq.), la soja (*Glycine max* (L.) Merr.) y la colza (*Brassica napus* L.); con una producción mundial de 17.38 millones de toneladas (MTn) para la campaña 2016/2017. En este sentido, Argentina es el cuarto productor de aceite con 7,3% de la producción mundial. En cuanto a la producción de semillas, para la campaña 2016/2017, se registró un área mundial cosechada de 24.97 millones de hectáreas (MHa), con una producción de 45.75 MTn. Es así que, los principales productores para esta campaña fueron: Ucrania (30,1%), Rusia (23,6%), Unión Europea (18,5%) y Argentina (7,3%), con el 79,5% de la producción total de semillas de girasol entre los cuatro países (USDA, 2017).

En la Argentina, el cultivo se extiende desde el sudeste de la región pampeana hasta la región chaqueña (Figura 2), con una superficie cosechada para la campaña 2016/2017 de 1.82 MHa y una producción de semillas de 3.54 MTn. Las principales provincias productoras en dicha campaña fueron Buenos Aires (1.89 MTn), Chaco (711.027 Tn), La Pampa (447.340 Tn) y Santa Fe (346.230 Tn). Mientras que en Córdoba se cosechó una superficie total igual a 16.970 Ha, con una producción de 45.756 Tn para la campaña 2016/2017 (MA, 2017). En este sentido, el mercado argentino comercializa girasol confitero y para aceite. El primero se destina para el consumo directo en forma de *snack*, como insumo para panaderías y como aderezo para ensaladas y otras comidas. El girasol para aceite proviene de cultivares orientados para alto contenido de aceite; siendo del tipo linoleico (aceite tradicional) (ASAGIR, s.f.). En cuanto a la producción nacional de aceite para la campaña 2016/2017 fue de 1.3 MTn, exportándose el 41,9% del volumen producido y destinando el resto al consumo interno (FAS USDA, 2017).

Cabe destacar que, los principales productos obtenidos de la molienda son el aceite crudo, el aceite refinado y las harinas proteicas. El primero se obtiene por prensado y extracción con solventes de la materia grasa contenida en la semilla. El *aceite refinado*, es el aceite crudo que se sometió a procesos químicos y físicos para dotarlo de sabor, aroma y color adecuados para su consumo. En tanto que, las *harinas proteicas* resultan de la extracción con solventes de la semilla y se las comercializa principalmente como insumo forrajero para ganado y aves de corral, por su alto contenido en proteínas y materia grasa (Melgarejo, 2003).



**Figura 2:** Área de producción de girasol en Argentina. **NEA:** Nordeste Argentino, **ER:** Entre Ríos, **SL:** San Luis, **LP:** La Pampa, **OBA:** Oeste de Buenos Aires, **CBA:** Centro de Buenos Aires, **SE:** Sureste, **SO:** Suroeste.

**Fuente:** Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR).

#### 4.3. Información nutricional

La semilla entera de girasol es una fuente de fibras, proteínas y vitamina E (tocoferoles). Además contiene entre 28 y 35% de aceite y, por ende, su contenido dependerá del porcentaje de cáscara y la concentración de aceite en el grano (Tabla 1), (Nagaraj, 2009; Seiler y Jan, 2010).

**Tabla 1:** Composición de la semilla de girasol.

Componentes	Valores en %
Cáscara	21 - 27
Aceite en grano	48 - 53
Proteína	14 - 19
Azúcares solubles	7,5 - 9,4
Fibra	16 - 27
Cenizas	2,4 - 3,0

**Fuente:** Adaptado de Nagaraj (2009).

El *aceite de girasol* es un aceite de primera calidad por su alta concentración en ácidos grasos insaturados (AGI) y por sus propiedades nutricionales. Su uso primario es en ensaladas y cocción de alimentos. Según su composición en ácidos grasos, se diferencian tres tipos de aceites que se caracterizan por tener bajo porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS) y alta cantidad de tocoferoles. El *aceite tradicional* es el más difundido y el que se destina para todo tipo de cocina. Se lo extrae de las variedades tradicionales que tienen entre 40 y 55% de aceite con 22,5% de ácido oleico (AOI) y 77,5% ácido linoleico. Este aceite, por sus propiedades secantes se lo utiliza en la elaboración de pinturas, barnices y plásticos; así como en



emulsificantes y surfactantes para la elaboración de agroquímicos. El *aceite medio oleico* tiene entre 62 y 79% de AOI y se caracteriza porque no necesita ser hidrogenado antes de ser usado en las frituras, además de poseer una composición saludable de AGI vs. AGS. El *aceite alto oleico* se caracteriza por tener 88% de AOI; lo cual lo hace menos susceptible a cambios oxidativos durante la refinación, el almacenaje y las frituras. Por otro lado, el valor nutricional de las *harinas proteicas* varía con el contenido de cáscara presente (Tabla 2), (Melgarejo, 2003; Nagaraj, 2009; Seiler y Jan, 2010; MA, 2016).

**Tabla 2:** Composición de las harinas de girasol. Valores expresados en %.

Constituyentes	Baja proteína (con cáscara)	Media proteína (parcialmente descascarada)	Alta proteína (completamente descascarada)
Proteína	29	37	42
Grasas	1	9,1	10
Carbohidratos	32	22,4	28
Fibra	29	15,8	15
Cenizas	6,56	6,5	8

**Fuente:** Adaptado de Nagaraj (2009).

Los tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) son antioxidantes liposolubles que inhiben la oxidación lipídica en comidas y sistemas biológicos, siendo el  $\alpha$ -tocoferol el mayoritario que hace al aceite menos estable para frituras. Por ello, el mejoramiento tradicional consiguió aumentar el contenido de  $\beta$ -y  $\gamma$ -tocoferoles y en consecuencia, la estabilidad oxidativa del aceite (Tabla 3) (Seiler y Jan, 2010).

**Tabla 3:** Composición de tocoferoles en la semilla de girasol.

Tipos de tocoferoles	Girasol silvestre (%)	Girasol cultivado (%)
$\alpha$ -tocoferol	99	92,4
$\beta$ -tocoferol	0,7	5,6
$\gamma$ -tocoferol	0,3	2,0

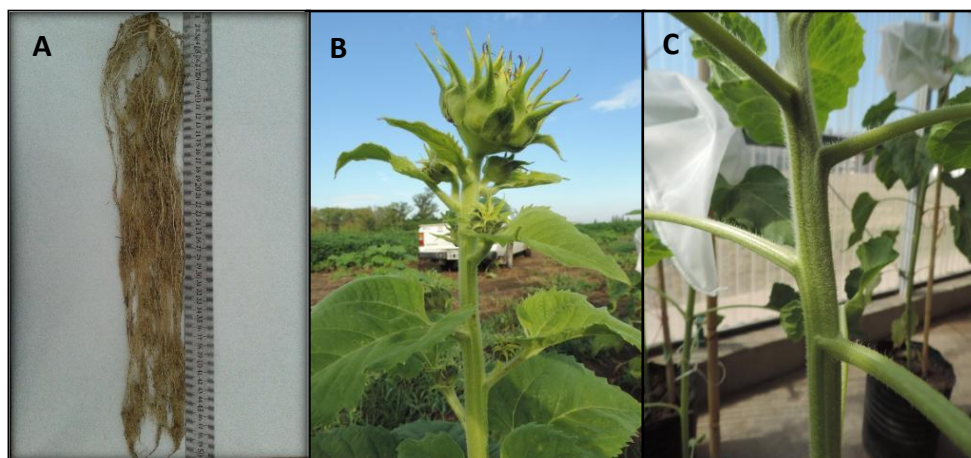
**Fuente:** Adaptado de Seiler y Jan (2010).

#### 4.4. Descripción botánica

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* var. *macrocarpus* (DC) Cockerell) es una especie diploide ( $2n=2x=34$ ), con un genoma haploide igual a 3.6 Gb (Badouin *et al.*, 2017); de ciclo anual y porte erecto. La raíz principal es pivotante y con ramificaciones (Figura 3A); alcanzando el máximo de su crecimiento durante la floración (4-5 m de profundidad) (Rossi, 1997). Las raíces secundarias se desarrollan cerca de la superficie, pudiendo alcanzar hasta 1 m de profundidad.

Además, las ramificaciones terciarias y cuaternarias colaborarían en la exploración de nuevas zonas y en la absorción de agua y nutrientes (Kugler y Godoy, 1964; Aguirrezábal *et al.*, 2001).

El *tallo*, pubescente y estriado, se vuelve leñoso terminando en el receptáculo floral o *capítulo* (Figura 3B y 3C). La forma cultivada posee un tallo no ramificado que alcanza entre 1,20 y 1,50 m de altura y presenta una sola inflorescencia. La forma silvestre en cambio, posee ramificaciones y puede alcanzar hasta 3 m de altura (Seiler y Jan, 2010).



**Figura 3:** **A)** Raíz de girasol. **B)** Tallo principal que termina en el capítulo. **C)** Tallo con estrías longitudinales, pubescente y no ramificado.

Los *cotiledones* son peciolados y cumplen la función de órganos fotosintetizadores (Figura 4A). Las *hojas* son pecioladas, aserradas en el margen y pubescentes en ambas caras. El borde de las primeras hojas es entero y el 2° par de hojas son lanceoladas con borde aserrado (Figura 4B). A partir del 3° par de hojas muestran la forma típica de corazón (Figura 4C). La disposición es opuesta en las primeras hojas y alterna a partir del 4° par de hojas. (Kugler y Godoy, 1964; Rossi, 1997; Seiler y Jan, 2010).



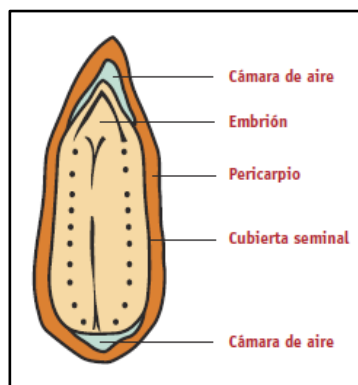
**Figura 4:** **A)** Cotiledones. **B)** Estadio vegetativo de cuatro hojas (V4). **C)** Hoja típica de girasol.

La *inflorescencia* es un disco plano que lleva insertas las flores tubulares en el centro y las liguladas en la periferia y está rodeada por las brácteas que forman el *involucro* (Figura 5A), (Rossi, 1997). Las *flores liguladas* son incompletas y estériles, y la corola tiene forma de pétalo de color amarillo (Figura 5B). Las *flores tubulares*, son perfectas y hermafroditas (Figura 5C). La *fecundación* es alógama sin embargo, se puede obtener descendencia fértil por autofecundación (Kugler y Godoy, 1964; Seiler y Jan, 2010).



**Figura 5:** **A)** Involucro. **B)** Flores liguladas. **C)** Flores tubulares.

La *semilla* o *cipsela* es un fruto seco, uniseminado con forma romboidal y alargada (Figura 6). Está constituido por el grano o pepita (que contiene al embrión) y el pericarpio o cáscara; la cual puede ser estriada, gris y blanca o completamente negra. Después de la fecundación, el llenado del grano se produce desde la periferia hacia el centro del capítulo; pudiendo albergar entre 1000 y 1500 semillas (Kugler y Godoy, 1964; Seiler y Jan, 2010).



**Figura 6:** Representación esquemática de una semilla de girasol en corte transversal. **Fuente:** Melgarejo, 2003.

#### 4.5. Ciclo ontogénico

El desarrollo del cultivo es una sucesión progresiva de cambios morfofisiológicos que dan lugar a distintas fases de desarrollo en la planta y cuya duración está controlada por la temperatura y el fotoperíodo. Es así que, el girasol presenta cuatro fases (Trápani *et al.*, 2003).

a) Siembra – emergencia: Durante esta fase se produce la imbibición de la semilla, la emergencia de la radícula y la elevación de los cotiledones sobre la superficie del suelo (Estado fenológico VE de la escala fotográfica de Zuil, 2011) (Figura 7A).

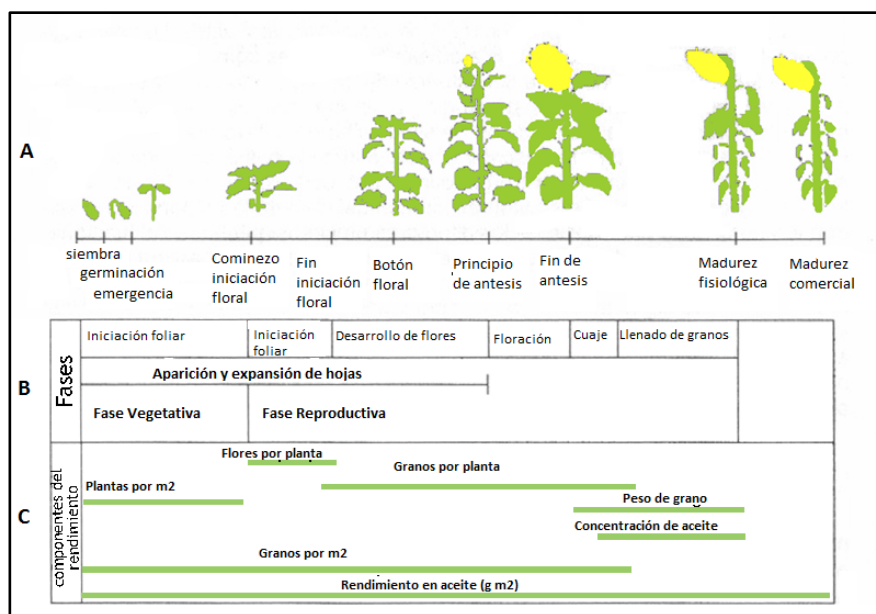
b) Emergencia – iniciación floral: Comienza con la emergencia de los cotiledones y finaliza cuando el ápice vegetativo deja de producir hojas y se transforma para producir la inflorescencia (Estado fenológico R1) (Figura 7A). Durante esta fase queda fijado el número de hojas por planta (Figura 7B). En este caso, las hojas verdaderas de más de 4 cm de largo se numeran (Vn); por lo que, el estado vegetativo continúa hasta aproximadamente V10 - 12 (dependiendo del genotipo), donde se inicia el estado reproductivo (R) (Zuil, 2011).

c) Iniciación floral – primera antesis: la fase reproductiva comienza con la aparición del primer primordio floral en el ápice y finaliza con el comienzo de la antesis de las flores periféricas (Estado fenológico R5) (Figura 7A). Las modificaciones que se producen en esta etapa van desde el cambio de forma del meristema (Estado floral 1 de la escala de Marc y Palmer, 1981) hasta la finalización del desarrollo de las flores (Estado floral 10). Una vez finalizada esta diferenciación y hasta la antesis las flores crecen y adquieren funcionalidad. Durante esta fase, la expansión foliar finaliza y el índice de área foliar alcanza su valor máximo (Figura 7B).

d) Primera antesis – madurez fisiológica: esta fase comienza con la antesis de las flores periféricas del capítulo y finaliza con la madurez fisiológica, cuando el receptáculo se torna de color marrón y los granos alcanzan su peso seco máximo (Estado fenológico R9) (Figura 7A). La floración se inicia con la apertura de los primeros 1 a 4 círculos florales que se abren diariamente durante 5 a 10 días, dependiendo de la temperatura. Después de la fecundación, el posterior llenado del fruto dependerá de la continuidad en el desarrollo del embrión; produciéndose el cuaje cuando se inicia el llenado efectivo del grano (Figura 7B).

La determinación de los componentes del rendimiento atraviesa las distintas fases del cultivo (Figura 7C). El número de plantas comienza a determinarse en la siembra y finaliza luego de la emergencia (Estado fenológico V4). El número de granos comienza a establecerse con la iniciación floral y finaliza después de la floración (Estado fenológico R6). Por otro lado, el peso del grano empieza a determinarse al final de la primera antesis, quedando establecido en

madurez fisiológica. El porcentaje de aceite, empieza a definirse después que el peso del grano y queda determinado antes de la madurez fisiológica (Aguirrezábal y Andrade, 2002).



**Figura 7:** **A)** Representación esquemática del ciclo ontogénico del girasol. **B)** Eventos asociados a las distintas fases. **C)** Período en los que se definen los componentes del rendimiento. **Fuente:** Trápani *et al.* (2003).

#### 4.6. Efectos del estrés hídrico y mecanismos fisiológicos de adaptación y tolerancia al mismo

La transpiración implica un flujo de agua desde la fuente (el suelo), hasta el destino (la atmósfera); el cual es impulsado por la diferencia de potencial hídrico ( $\Psi_a$ ) entre ambos compartimientos. Sin embargo, dicho movimiento depende de las resistencias al flujo del agua ofrecidas por los componentes del sistema. Por lo tanto, las resistencias aumentan a medida que el  $\Psi_a$  de la planta disminuye y el suelo se seca (Dardanelli *et al.*, 2003). En este sentido, se define al *déficit hídrico* como la disminución del  $\Psi_a$  que causará alteraciones en las funciones fisiológicas, afectando al crecimiento de la planta (Andriani, s.f.). En condiciones de campo, los cultivos pueden manifestar deficiencias hídricas durante las horas de máxima demanda atmosférica, cuando la absorción de agua no compensa las pérdidas por transpiración. Si este desbalance es prolongado en el tiempo se genera una situación de estrés hídrico que ocasionará grandes pérdidas en el rendimiento (Dardanelli *et al.*, 2003). Es así que, las plantas desarrollan estrategias para adaptarse y tolerar el estrés mediante diferentes mecanismos fisiológicos.

Debido a que tanto la división como la expansión celular son sensibles al déficit hídrico, su ocurrencia en etapas tempranas del desarrollo afectará a la expansión foliar, principalmente a través de una disminución en la tasa de expansión y de aparición de hojas. Por lo tanto, las plantas adecúan el tamaño de las hojas a la disponibilidad hídrica, regulando así la pérdida de agua por reducción de la intercepción de la radiación. Por otro lado, el movimiento foliar también permite reducir temporariamente el área expuesta a la radiación incidente, por pérdida de la turgencia que ocasionará el enrollamiento o el marchitamiento de las hojas. Si el déficit aumenta o se mantiene en el tiempo, la reducción en el área foliar se intensificará a través de la senescencia de las hojas (Aguirrezábal *et al.*, 2001; Dardanelli *et al.*, 2003).

A su vez, la elongación de las raíces también disminuye debido a la reducción de la presión de turgencia ( $\Psi_t$ ) causada por el estrés hídrico (Taiz y Zeiger, 2002). En consecuencia, ante un déficit hídrico moderado la parte aérea reduce su crecimiento mucho más que el de las raíces, produciéndose una relación raíz/vástago superior en aquellas plantas sometidas a estrés (Golberg, 2008). Además, bajo estas condiciones las raíces inducen una cascada de señalización hacia el vástago, causando cambios fisiológicos que determinarán el nivel de adaptación a dicho estrés. Diferentes moléculas señal (ácido abscísico, citoquininas, etileno y malato, entre otras), estarían implicadas en esta vía de señalización (Anjum *et al.*, 2011). Así, este mecanismo inducido por estrés resultaría en la disminución de la conductancia estomática para reducir la transpiración y conservar el agua en los tejidos.

En etapas tempranas del crecimiento, la conductividad estomática es elevada debido a que los estomas están abiertos. Esto se produce cuando hay buena disponibilidad hídrica en el suelo y menores demandas atmosféricas, manteniendo así el flujo transpiratorio alto. Sin embargo, cuando la disponibilidad hídrica no satisface a la demanda y el potencial hídrico ( $\Psi_a$ ) de la hoja disminuye, se produce el cierre estomático. Dicha respuesta se produce frente a condiciones de estrés superiores a los que provocan una reducción de la elongación celular; por ello, la asimilación de dióxido de carbono disminuye mucho más tarde que la expansión foliar (Boyer, 1970; Dardanelli *et al.*, 2003). Así que, la tasa fotosintética no solo se verá afectada por el cierre estomático sino también por un déficit hídrico severo, dado que la deshidratación celular inhibe la fotosíntesis por la acción directa del estrés sobre el metabolismo del cloroplasto (Turner *et al.*, 1985). No obstante, ante una limitación hídrica moderada se produce un aumento en la eficiencia del uso del agua (EUA), debido a que la reducción en la conductancia estomática limita más la pérdida del vapor de agua que la absorción de dióxido de carbono (Taiz y Zeiger, 2002).

El *ajuste osmótico* es otro rasgo adaptativo que permite mantener la presión de turgencia ( $\Psi_t$ ) elevada a bajos  $\Psi_a$ . Este consiste en la acumulación activa de solutos orgánicos (betaína, proles, azúcares y prolina) dentro de la célula provocando así, la reducción del potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) (Dardanelli *et al.*, 2003). Debido a esto, las células radicales pueden mantener un gradiente de  $\Psi_a$  que les permite sostener el flujo de agua hacia las raíces. Dicha osmorregulación involucra cambios metabólicos que permiten mantener la expansión celular, la apertura estomática, la fotosíntesis y el crecimiento en raíces, entre otros. Estos *osmolitos* son compuestos solubles inocuos, sin carga neta a pH fisiológico y se encuentran mayoritariamente en el citoplasma (Golberg, 2008).

#### 4.7. Mejoramiento de girasol en Argentina

Los primeros trabajos de selección en el país se iniciaron en 1931 a partir de germoplasma ruso, que se cultivaba en el país desde finales del siglo XIX. Posteriormente, en 1938 y en 1950, se desarrollan los programas de mejoramiento de girasol en las Estaciones Experimentales de INTA Pergamino y Manfredi, respectivamente. Así que, entre 1960 y 1965 se obtuvieron las primeras variedades locales. En este sentido, durante los siguientes años mediante el mejoramiento, se creó una rica variabilidad genética que permitió conformar tres tipos de germoplasmas: el de INTA Manfredi, el de INTA Pergamino y el derivado de las variedades de INTA Sáenz Peña. Los tres generados a partir de materiales de origen ruso, variedades locales y especies silvestres (Vásquez, 2002).

En la actualidad, ambos programas de mejoramiento han liberado germoplasma de valor fitotécnico, no solo en Argentina sino también en Estados Unidos y Europa; contribuyendo así a aumentar la ganancia genética de la especie. Si bien el objetivo principal de ambos programas es aumentar el rendimiento en kilos de aceite por ha, también dirigen sus esfuerzos a la obtención de líneas que reúnan otros caracteres tales como, buen comportamiento frente a *Verticillium*, *Downy mildew* y *Sclerotinia*, calidad industrial (alto contenido de ácido oleico) (González, 2016) y tolerancia al déficit hídrico. En este sentido, hasta la fecha se han desarrollado una gran variedad de líneas que cumplen con los objetivos especificados anteriormente (González *et al.*, 2015).

En este contexto, el Banco Activo de Germoplasma de INTA Manfredi (BAG-IM) alberga cerca de 1200 entradas en total con 96% de especies cultivadas y 4% especies silvestres. Entre las cultivadas se encuentran poblaciones, compuestos y líneas endocriadas, las cuales fueron generadas a partir de diferentes metodologías de mejoramiento y que provienen de diversos orígenes geográficos. Por lo tanto, este material constituye así una invaluable fuente de



variabilidad para el desarrollo de los programas de mejoramiento en curso (D. Álvarez, comunicación personal).

#### 4.8. Mejoramiento asistido por marcadores

Si bien el mejoramiento tradicional fue exitoso para la selección de caracteres simples, es poco eficiente para la mejora de caracteres cuantitativos como la tolerancia a estreses abióticos. Por ello, la biotecnología contribuye al mejoramiento convencional por medio de la selección asistida por marcadores moleculares; reduciendo el tiempo de desarrollo de nuevos cultivares e incrementando la eficiencia y la efectividad del proceso de selección (Collard *et al.*, 2005; Francia *et al.*, 2005). Por este motivo se ha impulsado el desarrollo y la aplicación de los marcadores moleculares en el mejoramiento de girasol, permitiendo realizar diferentes estudios de diversidad (Mandel *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2013; Mangin *et al.*, 2017), construcción de mapas de ligamiento genético (Rieseberg *et al.*, 1993; Berry *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 2002; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007; Talia *et al.*, 2010; Zubrzycki, 2014) análisis de QTLs (*Quantitative Trait Loc*) (Hervé *et al.*, 2001; Mokrani *et al.*, 2002; Ebrahimi *et al.*, 2008, 2009; Poormohammad Kiani *et al.*, 2008, 2009; Abdi *et al.*, 2012; Zubrzycki *et al.*, 2017), estudios poblacionales y filogenéticos (Filippi *et al.*, 2015) y de mapeo por asociación (Fusari *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012; Mandel *et al.*, 2013).

Un marcador genético se define como un carácter que presenta polimorfismo o variabilidad detectable en los individuos de una población segregante ( $F_2$ , RILs, DH o BC) y un tipo de herencia Mendeliana. Dicha variación puede corresponder desde cambios fenotípicos heredables (marcador morfológico) hasta la variación en la secuencia de ADN (marcador molecular) (Martínez *et al.*, 2010). Es así que, actualmente se cuenta con una gran variedad de marcadores moleculares desarrollados en girasol, tales como: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNAs*), (Rieseberg *et al.*, 1993; Quillet *et al.*, 1995), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Berry *et al.*, 1995; Gentzbittel *et al.*, 1995), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Gedil *et al.*, 2001; Mokrani *et al.*, 2002), microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Paniego *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2002), TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) (Hu y Vick, 2003), SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (Lai *et al.*, 2005; Kolkman *et al.*, 2007; Fusari *et al.*, 2008), entre otros. Entre ellos, los SSR han ganado preferencia debido a su alta reproducibilidad, buena cobertura genómica, herencia codominante, neutralidad y polimorfismo elevado (Varshney *et al.*, 2005). Estos marcadores consisten en pequeñas secuencias de 1-6 pb de largo, repetidas en tándem. En plantas, el repetido más frecuente es el dinucleótido AT con



un bajo grado de repetición por *locus* (5 a 100 unidades) y se distribuyen en el genoma con una frecuencia de uno cada 50.000 pb (Kalia *et al.*, 2011). La base genética del polimorfismo detectado en los microsatélites se centra en la variabilidad del número de repeticiones en tándem y, consecuentemente, del tamaño del microsatélite amplificado (Martínez *et al.*, 2010).

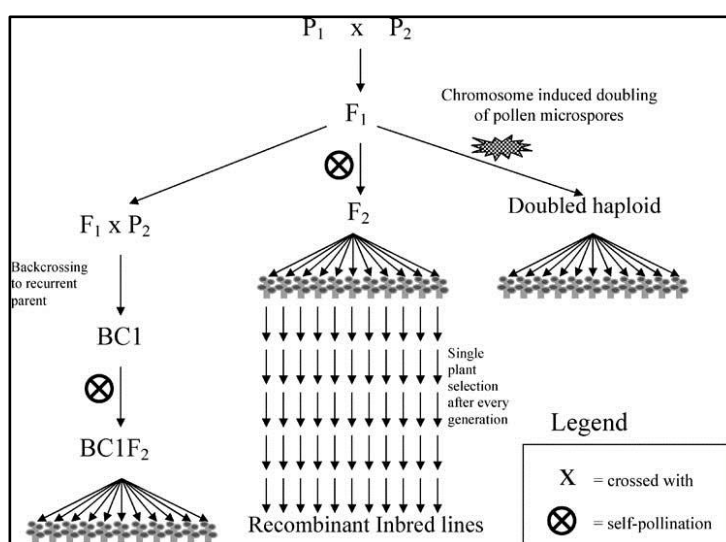
Los SSR pueden proceder de regiones genómicas (gSSR) o de secuencias expresadas (EST-SSR). La ventaja que ofrecen estos últimos es su alta calidad y robustez en el patrón de amplificación y en que detectan variabilidad en regiones codificantes del genoma; pudiendo contribuir a una selección alélica directa si se conoce su asociación con un carácter específico (Varshney *et al.*, 2005; Kalia *et al.*, 2011). Además, son transferibles entre especies en un 75% más que los gSSR (Pashley *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a que proceden de regiones codificantes conservadas, presentan menor polimorfismo que los gSSR.

#### 4.9. Mapeo genético

La selección asistida por marcadores (MAS: *Marker-Assisted Selection*) es un método por el cual el fenotipo es seleccionado por medio del genotipo del marcador (Collard *et al.*, 2005). Para ello, el primer objetivo que se debe cumplir es establecer un mapa de ligamiento genético con marcadores moleculares. Este es una representación gráfica lineal del orden más probable de los marcadores, determinado a partir de la frecuencia de recombinación observada entre ellos (Cervigni *et al.*, 2010). En este sentido, el mapeo biparental es una estrategia que consiste en determinar la ubicación de una región genómica o un QTL, responsable del carácter de interés, por medio de su asociación con un marcador molecular. Por consiguiente, el primer paso es establecer una población de mapeo ( $F_2$ , RILs, DH o BC) resultante del cruzamiento de dos líneas parentales contrastantes para el carácter en estudio (Figura 8) (Collard *et al.*, 2005). Debido a esto, la selección de los parentales es crucial a la hora de conformar dicha población, ya que deben cumplir con ciertas características como ser: líneas genéticamente distantes y presentar el mayor contraste posible en el carácter de interés (Cervigni *et al.*, 2010). Por lo expuesto, la evaluación fenotípica del carácter realizado para la selección de las líneas debe ser precisa y presentar un diseño experimental que permita encontrar diferencias significativas que acentúen dicho contraste.

Así mismo, la población de mapeo establecida debe presentar segregación mendeliana para los marcadores que resultaron polimórficos entre los parentales. A través de la prueba  $\chi^2$  es posible evaluar si las proporciones observadas son consistentes con la segregación esperada para el tipo de población utilizada ( $F_2$ , RILs, DH o BC) y el marcador analizado (dominante o

codominante) (Cervigni *et al.*, 2010). La mayoría de los marcadores se localizan en regiones neutras del genoma donde no están sujetos a una presión de selección que altere estas proporciones (Collard *et al.*, 2005); además de no verse afectados por las condiciones de crecimiento de la planta y ser detectados en cualquier estadio de desarrollo (Francia *et al.*, 2005). Sin embargo, es posible incluir en los mapas genéticos marcadores que presenten algún grado de distorsión de segregación sin alterar la solidez de aquellos (Rieseberg *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2002). Estos marcadores se utilizan para extender grupos de ligamiento y saturar zonas donde las distancias de recombinación son muy extensas.



**Figura 8:** Representación esquemática de las principales poblaciones de mapeo. **P<sub>1</sub>**: parental homocigota dominante para el carácter; **P<sub>2</sub>**: parental homocigota recesivo para el carácter; **F<sub>1</sub>**: filial 1; **F<sub>2</sub>**: filial 2; **BC<sub>1</sub>**: retrocruza 1; **BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>**: filial 2 de la retrocruza 1; **Recombinant Inbred Lines (RILs)**; **Doubled haploid (DH)**; **Brackcross (BC)**. **Fuente:** Collard *et al.* (2005).

#### 4.10. Efectos de la distorsión en el mapeo genético

La distorsión de la segregación se define como el desvío de las frecuencias genotípicas observadas con respecto a la proporción esperada en una población segregante (Lu *et al.*, 2002); y comúnmente se detecta por mapeo genético (Zhu *et al.*, 2007). Está influenciada por varios factores tales como el grado de proporción, la dirección y el efecto genético, los cuales a su vez varían con la especie, el cruzamiento, la población de mapeo y el tipo de marcador utilizado (Liu *et al.*, 2010). Por otro lado, la base genética de la distorsión estaría dada por la selección gamética y cigótica, la translocación cromosómica y los elementos transponibles; como así también por un

efecto citoplasmático materno (Zhao *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010). Así que, este fenómeno se ha documentado en diferentes cultivos como arroz (Xu *et al.*, 1997), girasol (Quillet *et al.*, 1995), maíz (Yan *et al.*, 2003), soja (Baumbach *et al.*, 2012) y trigo (Li *et al.*, 2015), entre otros.

La distribución de los marcadores distorsionados entre los grupos de ligamiento puede ser de dos tipos, al azar o en grupos. Los primeros son *loci* individuales que se desvían de las proporciones mendelianas hacia cualquiera de las clases parentales y se distribuyen al azar en el genoma. Los últimos, se desvían en la misma dirección y se agrupan en pequeñas regiones cromosómicas llamadas *regiones de distorsión de segregación* (RDS), dentro de las cuales se ubicarían los *loci* de distorsión de segregación (LDS) (Song *et al.*, 2006). Estos LDS controlarían diferentes efectos como la competencia del tubo polínico, la generación de polen letal, la fertilización preferencial y la selección cigótica (Liu *et al.*, 2010). Los primeros tres efectos corresponden a la selección gamética. Por lo tanto, los LDS que se expresan antes de la fecundación alterarían las proporciones gaméticas y genotípicas; sin embargo, los *loci* que se expresen después de la fecundación, afectarían a las frecuencias genotípicas solamente (Song *et al.*, 2006).

En girasol existen antecedentes de distorsión de segregación en marcadores utilizados en mapeo biparental (Rieseberg *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2002). Así, Maringolo (2007), encontró distorsión de segregación en el 62% de los marcadores analizados en una población de mapeo F<sub>2</sub> HA89 x RHA801, segregante para la tolerancia a la Podredumbre Húmeda del Capítulo (PHC); de los cuales el 12% mostraron igual proporción de homocigotas HA89, heterocigotas, y homocigotas RHA801, el 18% evidenciaron menor proporción de homocigotas para alelo del parental RHA 801 y el 69% mostraron una mayor proporción de heterocigotas. Así también Fernández (2014) realizó un análisis de segregación de marcadores SSR en una población F<sub>2</sub> R023 x R285, segregante para el carácter alto ácido oleico y encontró que el 100% de los marcadores analizados (41 SSR) presentaron desvíos hacia el parental R285 en el 60% de los individuos de la población.

En estudios previos realizados por el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología (INTA-EEA Manfredi), se encontró un 40% de distorsión en 42 SSR analizados en la población F<sub>2</sub> B59 x R432, segregante para estrés hídrico (datos no publicados). En este caso, la estrategia de mapeo utilizada fue BSA (*Bulked Segregant Analysis*) con seis individuos F<sub>2</sub> por cada *bulk* segregante T (tolerante) y S (susceptible). Estos resultados indican que para la construcción de mapas genéticos en girasol basados exclusivamente en SSRs es necesario identificar parentales no solo contrastantes para el carácter en estudio, sino también que generen poblaciones de

mapeo estables con marcadores que presenten segregación independiente para sus alelos. Por ello, sería pertinente analizar otras combinaciones posibles de parentales de manera tal de esclarecer si la distorsión detectada en dicho cruzamiento se debe a algún efecto causado por alguno de sus parentales o por la combinación de ambos.

#### **4.11. Importancia para el programa de mejoramiento del INTA**

La traslación del cultivo hacia zonas con mayor riesgo agroecológico y tierras de menor calidad y aptitud, ha hecho que los rendimientos, pese a los cambios tecnológicos incorporados, no hayan experimentado aumentos significativos en los últimos cinco años (FAS USDA, 2017). La región de la pampa arenosa, descripta ecológicamente como la región girasolera central de la Argentina, resulta un ambiente apto para el desarrollo del cultivo. Sin embargo, la evolución del área cultivada ha disminuido a partir de la década del '90 en detrimento de la superficie dedicada a la ganadería y a los cultivos extensivos. Una de las razones, es la pérdida de competitividad física y económica respecto a estos cultivos que se expandieron en la región (ASAGIR, s.f.).

En consecuencia, el cultivo del girasol se desplazó hacia zonas marginales caracterizadas por un déficit hídrico marcado, debido a la reducción en la frecuencia de las precipitaciones anuales. Estos cambios en la distribución estacional de las precipitaciones ocasionan un desfase entre los ciclos de los cultivos y la disponibilidad hídrica en el suelo. Por consiguiente, el estrés hídrico producido durante este período provoca pérdidas significativas de rendimiento, afectando también el contenido y la calidad química del aceite en el grano (D. Álvarez, comunicación personal). Por esto, el aumento de la tolerancia al déficit hídrico, en los híbridos de girasol es de gran importancia. Para lograr este objetivo resulta interesante explorar los recursos genéticos de la especie con el fin de identificar regiones genómicas asociadas a dicha tolerancia. En este sentido, en los últimos años se realizaron diversos trabajos con materiales del Banco de Germoplasma de Girasol (BAG-IM), con el fin de ampliar el conocimiento sobre el carácter e identificar nuevas fuentes de tolerancia al estrés hídrico (Bigo, 2005; Andrade *et al.*, 2009; Fernández, 2010; Moreno, 2010; Moreno *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014; Escalante *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2014; Fernandez, 2016).

En este contexto, el presente trabajo pretende determinar cuál sería la población segregante más adecuada para desarrollar un mapa de ligamiento genético sólido y medianamente saturado; que posteriormente permita identificar las regiones genómicas asociadas a la tolerancia al estrés hídrico.

## 5. HIPOTESIS

Es posible seleccionar la población de mapeo  $F_2$  más adecuada para construir un mapa genético en girasol, realizando una caracterización molecular y fenotípica previa de las líneas endocriadas parentales; buscando el mayor contraste para la tolerancia al estrés hídrico.

Es posible determinar a qué línea parental del cruzamiento B59xR432 se debe la distorsión de segregación para SSR, analizando si dicho efecto se reduce o desaparece en nuevos cruzamientos con otras líneas parentales no relacionadas.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Seleccionar una población de mapeo  $F_2$  de *Helianthus annuus* var. *macrocarpus* adecuada para el desarrollo de un mapa de ligamiento mediante el análisis molecular con marcadores SSR y la caracterización fenotípica de las líneas parentales.

### 6.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípicamente las líneas parentales para evaluar su respuesta al estrés hídrico en condiciones controladas en invernáculo.
2. Caracterizar genotípicamente las líneas parentales con al menos 100 marcadores SSR.
3. Identificar y seleccionar los marcadores SSR polimórficos entre las distintas líneas parentales para genotipificar las poblaciones  $F_2$ .
4. Analizar la segregación de los marcadores SSR polimórficos previamente seleccionados en cinco poblaciones segregantes  $F_2$ .
5. Seleccionar una población segregante  $F_2$  apta para el desarrollo de un mapa de ligamiento a emplear en mapeo para tolerancia al estrés hídrico.

## 7. MATERIALES Y METODOS

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio e invernáculo del Grupo de Biotecnología del INTA–EEA Manfredi. Además, tanto las líneas parentales como las poblaciones F<sub>2</sub> evaluadas en la presente tesis, fueron generadas por el Grupo de Mejoramiento de Girasol de INTA–EEA Manfredi, a cargo del Ing. Agr. Daniel Álvarez.

### 7.1. Caracterización fenotípica de las líneas parentales

#### 7.1.1 Material vegetal

Se evaluaron siete líneas endocriadas de girasol (Tabla 4) pertenecientes al panel de asociación establecido por el grupo de Biotecnología de INTA Castelar en conjunto con el Laboratorio de Biotecnología y el Grupo de Mejoramiento de Girasol del INTA-EEA Manfredi (Fusari *et al.*, 2012). Seis de estas siete líneas se caracterizaron previamente en el campo para determinar su respuesta frente al estrés hídrico (EH) durante todo el ciclo del cultivo (Andrade *et al.*, 2009). La clasificación de aquellas en susceptibles y tolerantes, se realizó con base en el rendimiento en grano y en aceite, y en el porcentaje de germinación relativa (PGR) en manitol (200 y 400 mM). Por su parte, el genotipo HA64 no fue evaluado en ese ensayo pero, está clasificado como tolerante al EH por Pereyra-Irujo *et al.* (2007) en un ensayo para estudiar la variabilidad genética en la expansión foliar bajo estrés. Con base en estos resultados y para profundizar en el conocimiento de las variables ecofisiológicas relacionadas al EH, se realizó una caracterización en invernáculo y durante el estadio vegetativo del cultivo por 16 días.

**Tabla 4:** Descripción de las siete líneas endocriadas evaluadas en la presente tesis.

Línea	Pedigree	Origen	Tipo de androesterilidad	Comportamiento frente a EH en campo
<b>B59</b>	derived B85-9-7	Argentina	Mantenedora	Susceptible
<b>R419</b>	HA89/T-//CF9	Argentina	Restauradora	Susceptible
<b>HA89</b>	“Vniimk 8931”	USA	Mantenedora	Intermedio
<b>R423</b>	M734/PNMR651	Argentina	Restauradora	Intermedio
<b>HAR4</b>	derived SAENZ PEÑA 74-1-2	Argentina	Mantenedora	Tolerante
<b>R432</b>	PION6440/91T608//R049	Argentina	Restauradora	Tolerante
<b>HA64</b>	derived VNIIMK 1646	USA	Mantenedora	Tolerante

**Fuente:** Adaptado de Pereyra-Irujo *et al.* (2007), Andrade *et al.* (2009) y Filippi *et al.* (2015).

### 7.1.2. Diseño experimental

La evaluación de las líneas se realizó durante los meses de septiembre y octubre de 2016, en el invernáculo del grupo de Biotecnología en Cultivos del INTA-EEA Manfredi; el cual cuenta un sistema automatizado de regulación del fotoperíodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), temperatura y humedad. Cada genotipo se implantó en macetas de 5 L, dispuestas según un diseño *alfa-lattice* con seis repeticiones por genotipo y bajo dos regímenes hídricos: control con el contenido de humedad a capacidad de campo (CC) y estrés hídrico moderado (EH: 70% de CC). Dicho estrés se aplicó a partir del estadio fenológico de V8 (estadio vegetativo de ocho hojas expandidas con más de 4 cm de largo) (Zuil, 2011) y durante 16 días consecutivos.

El sustrato utilizado se extrajo de los primeros 20 cm del perfil del suelo, proveniente de un lote productivo; que se caracteriza por ser un suelo Haplustol típico profundo (Serie Oncativo), bien drenado, de textura franco limosa (arena 12%, limo 62% y arcilla 26%) y de reacción neutra a ligeramente alcalina (pH 7 a 8,5). Presenta un contenido de materia orgánica del 2% en el horizonte superficial y una capacidad de almacenamiento de agua útil de 300 mm hasta los 2 m de profundidad (Lovera *et al.*, 1993; Lovera y Basanta, 2007). Dicho sustrato se analizó en cuanto a las siguientes constantes hídricas: porcentaje de humedad gravimétrica a capacidad de campo (Hg CC), al punto de marchitez permanente (Hg PMP) y al nivel de estrés (Hg EH); además de determinar la saturación y la densidad aparente. Todos los análisis fueron realizados por el Laboratorio de Suelos del INTA-EEA Manfredi.

La humedad gravimétrica (Hg) indica la cantidad de agua presente en el perfil del suelo a una profundidad dada y corresponde a la relación entre la masa de la fracción líquida y la masa de la fracción sólida; expresado como gramos de agua por gramos de suelo. Por lo tanto, la Hg a CC corresponde al agua retenida en el suelo luego de ser saturado por una lluvia o riego (potencial hídrico del suelo o  $\psi_{\text{suelo}} = -0,03$  MPa). La Hg al PMP es el contenido de agua que tiene el suelo cuando la planta se marchita y no recupera la turgencia con 100% HR ( $\psi_{\text{suelo}} = -1,5$  MPa). La saturación es la capacidad máxima de almacenamiento de agua y la densidad aparente es la relación entre el peso seco de una muestra de suelo y el volumen que ocupó dicha muestra a campo (Gil, 2002; Andriani, s.f.).

La Hg al nivel de EH se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Hg EH} = [(\text{Hg CC} - \text{Hg PMP}) * 0,3] + \text{Hg PMP},$$

donde 0,3 corresponde al 30% de reducción en la disponibilidad de agua con respecto a CC.

Se llenaron 84 macetas con aproximadamente 4 Kg de tierra cada una y se tomaron muestras de suelo para determinar la humedad al inicio del ensayo. Luego se sembraron cuatro semillas de girasol por genotipo, junto con tres semillas de maíz en cada maceta. Estas últimas actuaron como bomba extractora de agua durante los primeros días del ensayo hasta el inicio del estrés hídrico, momento en el que se las eliminó (Pereyra-Irujo *et al.*, 2007).

Después de la emergencia de los cotiledones siete días posteriores a la siembra, se ralearon las plántulas excedentes de girasol, dejando una sola por maceta. Desde ese momento y hasta el estadio V8, las macetas se mantuvieron bajo riego a CC. Una vez que las plantas llegaron a dicho estadio fenológico se suspendió el riego para alcanzar el nivel de estrés deseado (70% de CC); marcando el inicio del estrés propiamente dicho. Se retiraron las plantas de maíz y se taparon las macetas con polietileno para evitar la evaporación desde el suelo. El riego se realizó con base en las necesidades y requerimientos especiales de cada maceta en función de su consumo diario; el cual se determinó por medio del método gravimétrico.

### **7.1.3. Determinación de variables agronómicas y climáticas**

a) Variables climáticas: se registraron la temperatura y la humedad relativa ambiente cada hora mediante el uso de un *data logger* (Lascar, China), durante los dos meses que duró el ensayo. Con base en dichas variables se calculó el déficit de presión de vapor (DPV) diario como la diferencia entre la presión de vapor saturado ( $e_a$ ) y la presión de vapor actual ( $e_d$ ) y se expresa en kPa; según el procedimiento de Allen *et al.* (1998) y modificado por Abbate *et al.* (2004):



$$\begin{aligned}
 \text{VPD} &= e_a - e_d \\
 e_a &= e_{a(T_{\max})} \theta + e_{a(T_{\min})} (1 - \theta) \\
 e_d &= [e_{d(T_{\max})} + e_{d(T_{\min})}] / 2 \\
 e_{d(T_{\max})} &= e_{a(T_{\max})} \text{RH}_{\min} / 100 \\
 e_{d(T_{\min})} &= e_{a(T_{\min})} \text{RH}_{\max} / 100 \\
 e_{a(T_i)} &= 0.611 \exp \left( \frac{17.27 T_i}{T_i + 237.3} \right)
 \end{aligned}$$

donde VPD: *vapor pressure deficit*;  $\theta$  es un parámetro ponderador: 0,72 a  $T^{\circ}_{\max}$  y 0,28 a  $T^{\circ}_{\min}$ ;  $T_i$ :  $T^{\circ}_{\max}$  o  $T^{\circ}_{\min}$ ;  $T_{\max}$ : temperatura máxima;  $T_{\min}$ : temperatura mínima;  $\text{RH}_{\min}$ : humedad relativa mínima;  $\text{RH}_{\max}$ : humedad relativa máxima.

b) Fenología: se registró desde la emergencia de los cotiledones y cada dos o tres días para determinar el estado fenológico de cada planta. Para ello se utilizó la escala fenológica fotográfica de Zuil (2011). El objetivo de esta medición fue determinar el momento correcto para el inicio del estrés.

c) Área Foliar (AF): se registró el AF total sobre todas las hojas medibles (>1 cm) de cada planta midiendo el ancho de cada hoja en cm. Dicha variable se midió en diferentes momentos del ensayo (7, 14, 21, 28 y 35 días post-emergencia) así como también al inicio y al final de la imposición del estrés. Para el cálculo del AF por planta se utilizó un modelo alométrico ajustado a partir de un muestreo destructivo con la siguiente fórmula y se expresa en  $\text{cm}^2$ .

$$\text{AF}_i = [0,6185 * (\text{AH}_i)^2] + [(2,1849 * \text{AH}_i) + 0,5471]$$

$$\text{AFTp} = \sum \text{AF}_i$$

$$\text{GAF} = \text{AFTp}_{(\text{fEH})} - \text{AFTp}_{(\text{iEH})}$$

donde,  $\text{AF}_i$ : área foliar de la hoja  $i$ ;  $\text{AH}_i$ : ancho de la hoja  $i$ ;  $\text{AFTp}$ : área foliar total por planta;  $\text{GAF}$ : ganancia de área foliar;  $\text{AFTp}_{(\text{iEH})}$ : área foliar total por planta al inicio del estrés hídrico;  $\text{AFTp}_{(\text{fEH})}$ : área foliar total por planta al final del estrés hídrico.

d) Peso fresco y peso seco total: dichos pesos se estimaron al inicio por medio de modelos alométricos a partir del volumen de la planta (altura planta \* diámetro de tallo) y el AF (calculado como se muestra en el punto anterior). Las mediciones se registraron cada 7, 14, 21, 28 y 35 días

post-emergencia y al final del estrés por un muestreo destructivo. Cada muestra verde se pesó (balanza Metler Toledo, Suiza) y se secó en estufa a 105 °C, durante 24 h; registrándose posteriormente los pesos secos respectivos (balanza Denver Instrument, USA). Así mismo, el peso fresco se utilizó para corregir el peso objetivo de las macetas y así obtener un dato real del agua transpirada diariamente y del agua disponible en la maceta. Los pesos se calcularon según las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} VP &= 3,14 [(DT/10/2)^2 * AP] \\ PFt &= (1,576 * VP) + 6,5963 \\ PFh &= (0,0899 * AFTp) + 0,1598 \\ PFTp &= 0,7494 * [(PFt * PFh)^{0,4367}] \\ PSTp &= [0,0007 * (VP * AFTp)] + 0,1955 \end{aligned}$$

donde VP: volumen de la planta; DT: diámetro de tallo; AP: altura de planta; PFt: peso fresco del tallo; PFh: peso fresco de la hoja; AFTp: área foliar total por planta; PFTp: peso fresco total estimado por planta; PSTp: peso seco total estimado por planta.

e) Transpiración total acumulada (Tta): hace referencia a la pérdida de agua en gramos, en forma de vapor desde la superficie de la hoja. El agua transpirada se determinó mediante método gravimétrico y registrando el consumo hídrico diario durante el período de estrés efectivo; se expresa en gH<sub>2</sub>O día<sup>-1</sup>.

$$\begin{aligned} TD_x &= PM_x - (PM_{x-1} - AR_{x-1}) \\ Tta &= \sum TD_x \end{aligned}$$

donde, TD<sub>x</sub>: transpiración diaria del día x; PM<sub>x</sub>: peso de la maceta del día x; PM<sub>x-1</sub>: peso de la maceta del día anterior (x-1); AR<sub>x-1</sub>: agua de riego del día anterior (x-1); Tta: transpiración total acumulada para el periodo de estrés efectivo por maceta.

f) Tasa de Asimilación Neta (TAN): indica la eficiencia fotosintética de la planta y representa la ganancia de peso seco generada por unidad de área foliar en un período de tiempo determinado y se expresa en g cm<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>. Esta variable se determinó mediante el registro del AF detallado en el punto c) y el peso seco (PS) total incluyendo raíces registrado al inicio y al final del estrés como se detalló en el punto d); mediante la siguiente fórmula:

$$TAN = \left( \frac{PS_2 - PS_1}{AF_2 - AF_1} \right) \left( \frac{\log AF_2 - \log AF_1}{t_2 - t_1} \right),$$

donde  $PS_2$  y  $PS_1$  son peso seco total al final y al inicio del estrés, respectivamente;  $AF_2$  y  $AF_1$  son el área foliar total al final y al inicio del estrés, respectivamente;  $\log$  es el logaritmo natural del área foliar y  $t_2$  y  $t_1$  son tiempo (valor final e inicial, en todos los casos).

g) Eficiencia en el Uso de Agua (EUA): se define como la cantidad de materia seca producida por unidad de agua transpirada y se expresa en  $g\ g^{-1}$ . Dicha variable se estimó a partir de la siguiente fórmula:

$$EUA = \frac{GPS}{Tta}$$

$$GPS = PSTp_{(fEH)} - PSTp_{(iEH)}$$

donde, EUA: eficiencia en el uso del agua; GPS: ganancia de peso seco; Tta: transpiración total acumulada durante el período de estrés efectivo;  $PSTp_{(fEH)}$ : peso seco total por planta al final del estrés hídrico;  $PSTp_{(iEH)}$ : peso seco total por planta al inicio del estrés hídrico.

h) Relación Tasa Transpiratoria (TT) – Déficit de Presión de Vapor (DPV): la TT se define como el agua transpirada por unidad de área foliar y unidad de tiempo (Tanner *et al.*, 1983). La TT diaria se calculó como el cociente entre el agua transpirada y el AF diarios por planta y se expresa como  $g\ cm^{-2}\ día^{-1}$ . El DPV se calculó según Allen *et al.* (1998) como se detalló en el punto a). Dicha relación se estableció a partir de la determinación de la pendiente y el punto de quiebre o punto C, por medio de un modelo de regresión no lineal *Plateau*.

Los modelos alométricos utilizados para las estimaciones de las variables, se ajustaron al inicio del estrés mediante un muestreo destructivo. Los modelos matemáticos se construyeron según Vega *et al.* (2001) y Druetta (2016). Al finalizar los 16 días de estrés efectivo se realizó un muestreo destructivo registrándose fenología, área foliar, altura, diámetro de tallo y peso fresco de cada planta.

#### **7.1.4. Análisis estadístico**

Los datos fenotípicos se analizaron mediante estadística descriptiva, Análisis de Componentes Principales (ACP), regresión lineal simple y no lineal *Plateau*, modelos lineales generalizados mixtos para determinar diferencias significativas y comparación de medias mediante la prueba LSD de Fisher. El grado de correlación entre las variables se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Para el análisis estadístico se utilizaron los programas InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011) y SAS *University Edition* 3.6 (SAS, 2016).

### **7.2. Caracterización genotípica de las líneas parentales**

#### **7.2.1. Extracción de ADN**

El ADN de las siete líneas parentales previamente descritas (Tabla 4) se extrajo a partir de hojas jóvenes liofilizadas durante 60 h en liofilizador modelo FreeZone 7949030 (LABCONCO, USA) y mediante el protocolo de extracción con CTAB modificado, según Doyle y Doyle (1987) (Anexo: protocolo 1). Para determinar la calidad del ADN se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 0,8%, con *buffer* TAE 1X, durante 40 min a 90 V en una cuba horizontal modelo Horizon 11.14 Watman (Biometra, Alemania) y tinción con *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* 10000X (Biotium, USA). La visualización del ADN extraído se realizó empleando un digitalizador de imagen (Bio-Rad, USA) y para el análisis de la corrida se utilizó el programa *Quantity One* 1 D (Bio-Rad, USA). La cuantificación del ADN extraído se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### **7.2.2. Amplificación por PCR**

Se analizaron un total de 127 marcadores microsatélites (SSR) disponibles en base pública (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>), de los cuales 116 son gSSR desarrollados por el Instituto de Biotecnología del INTA Castelar (Serie HA) (Paniego *et al.*, 2002) y por la Universidad de Oregon (Serie ORS) (Tang *et al.*, 2002); además de 11 EST-SSR analizados previamente por Filippi *et al.* (2015) en el panel de asociación (Anexo: tabla 1). Las reacciones de amplificación del ADN de los parentales se realizaron mediante PCR *multiplex* diseñadas con el programa Multiplex Manager (Holleley y Geerts, 2009). Los parámetros seleccionados incluyeron: un máximo de hasta tres cebadores por reacción con una diferencia mínima de separación entre cebadores de 50 pb. Dichas reacciones se desarrollaron utilizando el *kit multiplex* PCR de

QIAGEN (Hilden, Alemania) y ajustando el volumen final a 5  $\mu$ L con 1X de *master mix*, 0,2  $\mu$ M de cebadores (*forward* y *reverse*) y 10 ng de ADN genómico. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador AB *GeneAmp system* 9700 (Applied Biosystems, USA) con el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial de 15 min a 95°C, seguidos por 30 ciclos compuestos por desnaturalización de 30 s a 94°C, hibridación de 90 s a 60°C y extensión de 60 s a 72°C, seguidos de una extensión final de 20 min a 60°C. Los cebadores que no formaron parte de ninguna PCR *multiplex* se amplificaron solos en reacciones separadas en un volumen final de 6  $\mu$ L que incluyeron *buffer* de PCR 1X, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas, Lituania), 0,25  $\mu$ M de cebadores (*forward* y *reverse*), 0,25 U de Taq polimerasa *Platinum* (Invitrogen, USA) y 10 ng de ADN genómico. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 10 min a 94°C, seguido por 30 ciclos compuestos por desnaturalización de 30 s a 94°C, hibridación de 90 s a 60°C y extensión de 60 s a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C. La amplificación de los fragmentos se comprobó en geles de agarosa al 2% con *buffer* TAE 1X, durante 40 min a 90 V en una cuba horizontal modelo Horizon 11.14 Watman (Biometra, Alemania) y tinción con *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* 10000X (Biotium, USA). Para la visualización de los fragmentos amplificados, se empleó un digitalizador de imagen (Bio-Rad, USA).

### **7.2.3. Genotipificación en geles de poliacrilamida**

Los fragmentos amplificados se resolvieron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% (p/v) en una cuba vertical Gibco-BRL modelo S2 (Biometra, Alemania). Los *buffers* de corrida utilizados fueron TBE 0,5X en la parte superior y TBE 1X en la parte inferior. El tiempo de corrida fue de aproximadamente 1h 30 min a 2 h dependiendo del tamaño del fragmento amplificado, a 60 W. Como patrón de peso molecular se utilizó un *DNA ladder* de 10 bp (Invitrogen, USA). La visualización de los fragmentos, se realizó mediante la tinción con Nitrato de Plata según el protocolo modificado de Creste *et al.* (2001) (Anexo: protocolo 2). El tamaño de los alelos amplificados se estimó por comparación con el peso molecular del patrón utilizado.

### **7.2.4. Análisis de diversidad de marcadores**

La diversidad genética por *locus* se determinó a partir de la riqueza alélica, mediante el cálculo del número total de alelos detectados, el número de alelos por *locus* ( $N_a$ ), el número efectivo de alelos por *locus* ( $N_e$ ) y a partir del cálculo de los siguientes índices de diversidad: D,  $H_e$  y PIC.

La diversidad genética (D) es una medida de la variabilidad apropiada para poblaciones endocriadas; es una función de la heterocigosidad y se calcula como  $D=1-\sum p_{ij}^2$ , donde  $p_{ij}^2$  es la frecuencia del alelo  $i$  en el *locus*  $j$ .

La heterocigosidad esperada o insesgada de Nei (He) (Nei, 1978) por *locus*, se calcula como  $\hat{H} = \frac{N}{N-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2 \right)$ , donde N es el tamaño de la muestra.

El contenido de información polimórfica (PIC) (Botstein *et al.*, 1980) por *locus*, se calculó como  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2 - 2 \sum_{i=2}^l \sum_{j=1}^{i-1} (p_i^2 p_j^2)$ .

### 7.2.5. Análisis de conglomerados

A partir de los datos genotípicos obtenidos con los marcadores SSR para cada línea parental y con el objetivo de establecer la relación genética entre estas, se realizó el análisis de conglomerados a partir de las distancias genéticas calculadas con el índice de similitud de Nei *Standard* (Nei, 1972) y las medias aritméticas calculadas con UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average*). Se calculó el índice de correlación cofenética para determinar el grado de correlación entre los datos de la matriz y el dendrograma generado. Tanto para el punto anterior (7.2.4) como para este, el análisis se realizó con el programa Infogen (Balzarini y Di Rienzo, 2011).

### 7.3. Caracterización genotípica de las poblaciones F<sub>2</sub> segregantes

Cuatro de las líneas parentales caracterizadas inicialmente (B59, R419, R423 y R432) se utilizaron para generar cinco poblaciones F<sub>2</sub> segregantes para la tolerancia al estrés hídrico. La selección de las líneas parentales para la generación de las siguientes poblaciones se basó en la caracterización fenotípica realizada previamente en el campo, por el Grupo de Mejoramiento de Girasol del INTA-EEA Manfredi (Andrade *et al.*, 2009). Dichas poblaciones se denominaron de acuerdo al cruzamiento que le dio origen, estas son: B59xR432, B59xR423, R423xR419, R419xR423 y R419xR432. Cabe aclarar que dichas poblaciones habían sido generadas previamente en 2005, quedando a la espera de ser analizadas mediante marcadores moleculares. Así, un total de 70 individuos de cada población F<sub>2</sub> se analizaron mediante 34 SSR polimórficos seleccionados previamente a partir de la caracterización de las líneas parentales

descriptas en el punto 7.2 (Anexo: tablas 12 a 16). La extracción del ADN se realizó según lo detallado en el punto 7.2.1. Los 34 marcadores se seleccionaron con base en su correcta amplificación dentro de la PCR *multiplex* y en su buena resolución en el gel de poliacrilamida. Las reacciones de amplificación se realizaron mediante PCR *multiplex* diseñadas como se detalló en el punto 7.2.2 (página 36). Para las amplificaciones *multiplex* (dos o tres cebadores por reacción) se utilizó el *kit* para PCR *multiplex* de QIAGEN (Hilden, Alemania) en un volumen final de 5  $\mu$ L y 10 ng de ADN molde; y las amplificaciones simples (un cebador por reacción) se realizaron en un volumen final de 6  $\mu$ L y 10 ng de ADN genómico, según lo descrito en el punto 7.2.2 (página 36). Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador AB *GeneAmp system* 9700 (Applied Biosystems, USA) con el programa de ciclado específico para las PCR *multiplex* y simples descriptas en el punto 7.2.2 (página 36). La amplificación de los fragmentos se comprobó en geles de agarosa al 2%, teñidos con *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* 10000X (Biotium, USA) y visualizados con un digitalizador de imagen (Bio-Rad, USA) (ver punto 7.2.2, página 36). Los fragmentos amplificados se resolvieron por electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% (p/v) en una cuba Gibco-BRL modelo S2 (Biometra, Alemania) (ver punto 7.2.3, página 37). La visualización de los fragmentos, se realizó mediante la tinción con Nitrato de Plata según el protocolo modificado de Creste *et al.* (2001) (Anexo: protocolo 2), y los alelos detectados se codificaron según el manual del programa utilizado: A (alelo materno), B (alelo paterno) y H (heterocigota).

#### **7.4. Análisis de segregación de marcadores microsatélites en las poblaciones F<sub>2</sub> segregantes**

Para el análisis de segregación de marcadores se utilizó el programa MapDisto 1.7.7 (Lorieux, 2012), con el fin de determinar si presentaban segregación mendeliana esperada (1:2:1) para un marcador codominante como los SSR en una población F<sub>2</sub>. Se consideraron como marcadores con segregación mendeliana aquellos que presentaron valores de  $\chi^2 \leq \chi^2$  crítico para un nivel de significancia  $\alpha=0,05$ . Asimismo, para determinar la posible causa de la distorsión en dichos marcadores, se analizó la segregación de las frecuencias alélicas ( $p=q$ ) y genotípicas ( $p^2:2pq:q^2$ ) mediante la prueba de  $\chi^2$  (Pham *et al.*, 1990).

### **7.5. Selección de una población $F_2$ segregante apta para el desarrollo de un mapa de ligamiento de marcadores**

A partir de los datos fenotípicos y genotípicos de las líneas parentales y del análisis de segregación de los marcadores, se seleccionó aquella población  $F_2$  que presentó el menor porcentaje de marcadores distorsionados ( $\chi^2 > \chi^2_{\alpha=0,05}$ ), cuyas líneas parentales presentaron mayor nivel de polimorfismo, mayor distancia genética y mayores diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ) para las variables fenotípicas evaluadas en el ensayo de invernáculo.



## 8. RESULTADOS

### 8.1. Caracterización fenotípica de las líneas parentales

Con el objetivo de caracterizar fenotípicamente las siete líneas endocriadas de girasol cultivado, se realizó un ensayo en invernáculo durante el período vegetativo, para determinar su comportamiento frente al estrés hídrico (Figura 9). Para evitar el sombreado que las plantas pudieran provocarse entre sí, las macetas se dispusieron a una distancia de 25 cm. Las constantes hídricas analizadas en el sustrato utilizado se muestran en la tabla 5.



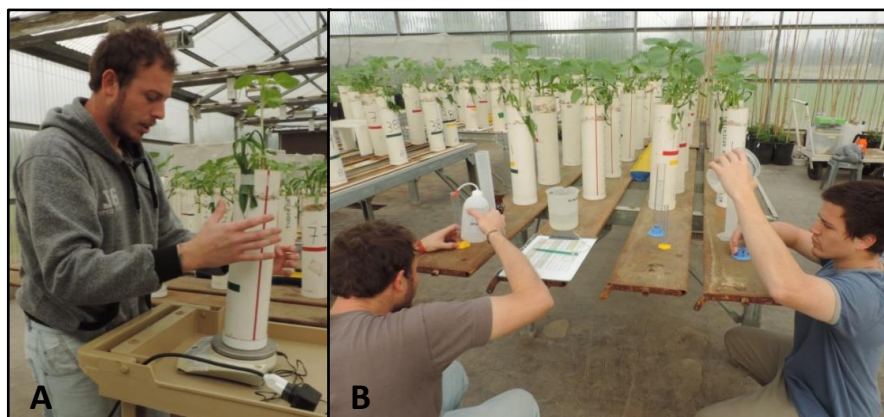
**Figura 9:** Distribución de macetas según un diseño *alfa-lattice*. Macetas a capacidad de campo (rótulos en verde); macetas bajo estrés (rótulos en rojo).

**Tabla 5:** Constantes hídricas del sustrato utilizado. Valores expresados en %.

Constantes Hídricas	Valores (%)
Hg PMP	13,3
Hg CC	30,0
Hg EH	18,0
Saturación	50,0
Densidad aparente	1,31 g cm <sup>-3</sup>

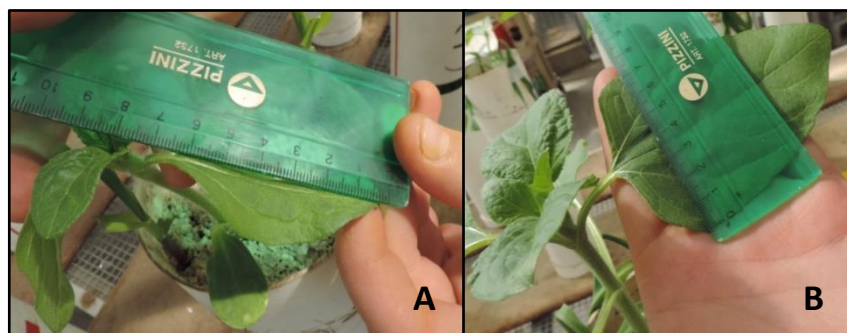
**Hg PMP:** humedad gravimétrica a punto de marchitez permanente; **Hg CC:** humedad gravimétrica a capacidad de campo; **Hg EH:** humedad gravimétrica a nivel de estrés hídrico.

Con base en dichas constantes, se determinó el peso objetivo para cada tratamiento control (CC) y estrés (EH), el cual se mantuvo con el riego aplicado diariamente mediante el método gravimétrico detallado en Materiales y Métodos (Figura 10).

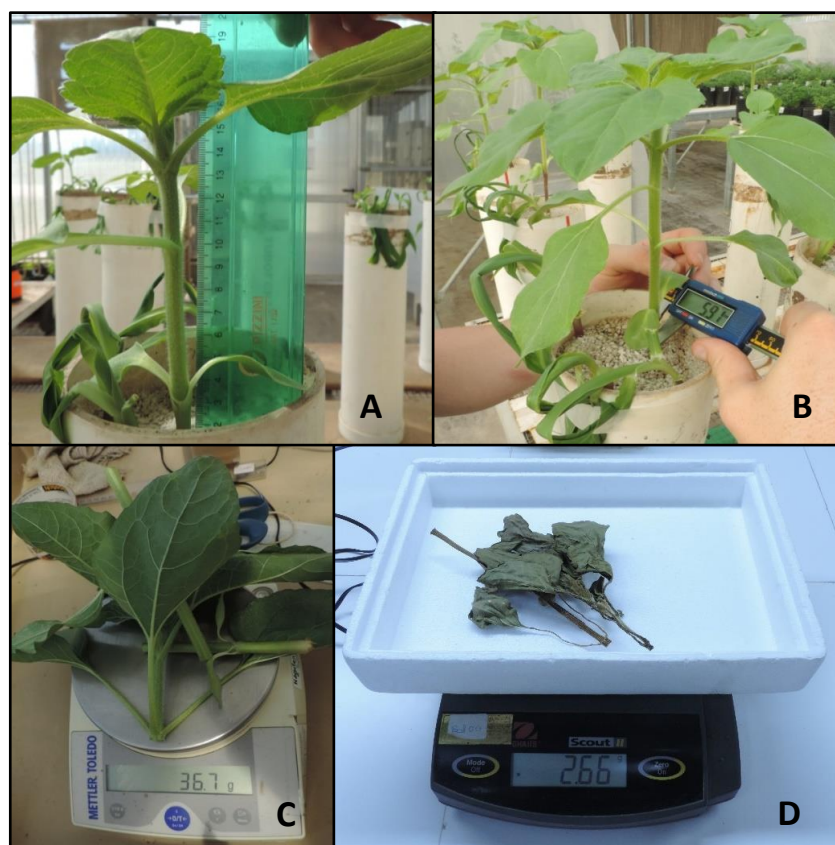


**Figura 10: A)** Registro diario del peso de las macetas desde el estadio fenológico V2 hasta el final del estrés. **B)** Riego diario.

Después de la emergencia de los cotiledones y hasta el estadio fenológico V8, las macetas se mantuvieron a CC. Cada dos o tres días se registró la fenología para determinar el momento justo para el inicio del estrés. Es así que, cuando los genotipos alcanzaron el estadio V8 se suspendió el riego para llegar al nivel de estrés deseado (70% de CC) y dar inicio del estrés propiamente dicho. Tanto al inicio como al final de los 16 días de estrés hídrico efectivo, se registró fenología (Figura 11A), área foliar (Figura 11B), altura y diámetro de tallo (Figura 12A y 12B) y solo al final del estrés se registró el peso fresco de la parte aérea (Figura 12C) y el peso seco total (parte aérea: Figura 12D y raíces) mediante un muestreo destructivo. Las observaciones sobre la raíz, revelaron que las plantas han explorado el volumen total de suelo en la maceta. Así todo el contenido hídrico transpirable estuvo accesible a las plantas. A partir de estas variables se determinaron la ganancia de área foliar (GAF), la transpiración total acumulada (Tta) durante los 16 días de estrés, la tasa de asimilación neta (TAN), la eficiencia en el uso del agua (EUA) y la relación tasa de transpiratoria (TT) – déficit de presión de vapor (DPV).



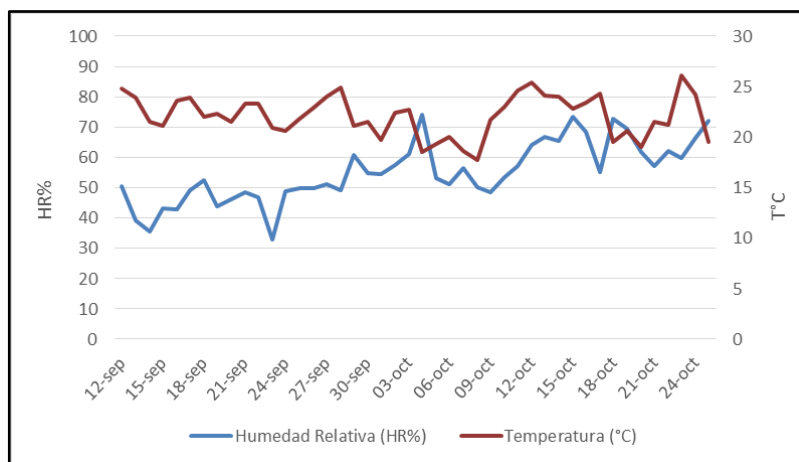
**Figura 11:** A) Fenología: se consideraron todas las hojas expandidas con un largo no menor a 4 cm. B) Área foliar: se registró el ancho de todas las hojas medibles >1 cm.



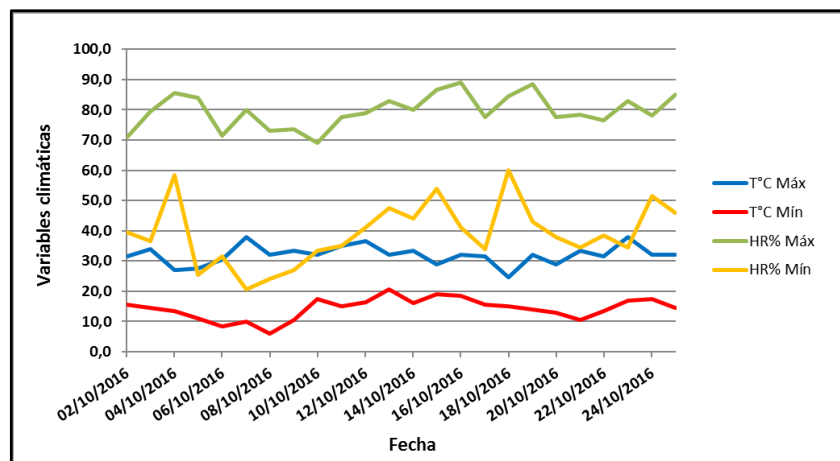
**Figura 12:** Muestreo destructivo: A) Altura de la planta. B) Diámetro del tallo. C) Peso fresco. D) Peso seco.

Las variables ambientales, temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ) y humedad relativa (HR%) se registraron diariamente, cada hora, durante los dos meses que duró el ensayo, como se observa en la figura 13. En esta se puede visualizar que la temperatura evidenció menor variación a lo largo del

ensayo que la HR%. La temperatura promedio registrada para el periodo de evaluación fue de 14°C mínima y 32°C máxima, con una humedad relativa promedio de 39% mínima y 79% máxima y un DPV diario promedio igual a 1,43 kPa mínimo y 3,24 kPa máximo. La figura 14 muestra la evolución de la temperatura y la humedad para los días que duró el período de estrés efectivo.



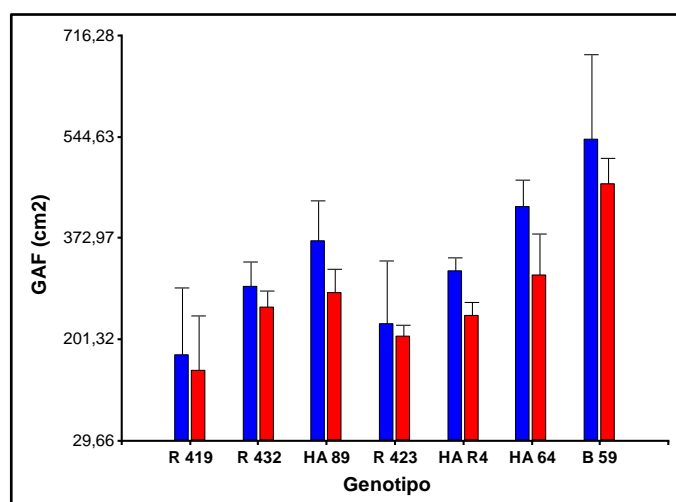
**Figura 13:** Evolución de la temperatura (T°C) y la humedad relativa (HR%) para el período completo de evaluación.



**Figura 14:** Evolución de la temperatura (T°C) y la humedad relativa (HR%) durante los días de estrés efectivo.

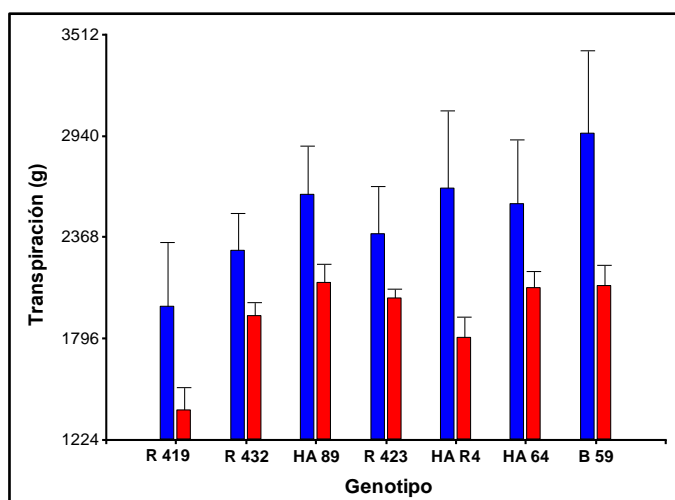
El análisis estadístico de las variables ecofisiológicas evaluadas se realizó teniendo en cuenta el período de estrés efectivo de 16 días. Para determinar si existen diferencias significativas entre genotipos y tratamientos para dichas variables, se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos, con efectos fijos para el factor estrés (con dos niveles CC y EH), el factor genotipo (con siete niveles) y sus interacciones (14 niveles). Como efecto aleatorio se incluyeron las repeticiones de cada nivel de tratamiento anidadas en cada mesada. En el anexo (página 84) se muestran las medias, desvíos estándar y coeficientes de variación por genotipo (Tabla 2), por tratamiento (Tabla 3) y por genotipo por tratamiento de las variables evaluadas (Tabla 4).

El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,0001$ ) para ganancia de área foliar (GAF), siendo B59 ( $502,72 \pm 109,16 \text{ cm}^2$ ) el que se diferenció del resto de las líneas por presentar el valor promedio más alto para esta variable. En cambio, R419 fue el genotipo con menor GAF promedio ( $162,43 \pm 100,39 \text{ cm}^2$ ) (Figura 15) (Anexo: tabla 2). También se observaron diferencias significativas entre tratamientos CC ( $333,90 \pm 143,94 \text{ cm}^2$ ) y EH ( $273,00 \pm 104,37 \text{ cm}^2$ ); con una reducción del 18% en GAF promedio para las plantas bajo estrés ( $p = 0,0004$ ). Por otro lado, no se evidenció interacción GxT significativa; sin embargo, el único genotipo que mostró una reducción importante del AF entre EH y CC fue HA64 con un 27% de diferencia ( $p = 0,0080$ ) (Anexo: tablas 4 y 5); no así la línea R423 (9%) que fue el genotipo con menor diferencia en GAF entre CC y EH (Figura 15) (Anexo: tabla 4).



**Figura 15:** Ganancia de área foliar ( $\text{cm}^2$ ) para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo. Tratamiento **CC**: barras azules; tratamiento **EH**: barras rojas.

Para la variable transpiración total acumulada (Tta) también se observaron diferencias significativas para genotipo y tratamientos ( $p < 0,0001$ ), siendo no significativa la interacción GxT ( $p = 0,0696$ ). En este caso se observó que la línea B59 fue el genotipo con mayor transpiración promedio ( $2524,00 \pm 554,20 \text{ gH}_2\text{O.día}^{-1}$ ) y el genotipo R419 presentó un valor promedio menor para dicha variable ( $1685,75 \pm 399,72 \text{ gH}_2\text{O.día}^{-1}$ ) (Anexo: tabla 2). Los demás genotipos presentaron valores intermedios similares (Figura 16). En cuanto a la diferencia entre tratamientos, se produjo una reducción del 23% de la transpiración promedio entre CC ( $2483,95 \pm 441,15 \text{ gH}_2\text{O.día}^{-1}$ ) y EH ( $1921,12 \pm 257,56 \text{ gH}_2\text{O.día}^{-1}$ ). Esta situación se hizo evidente entre los tratamientos de los genotipos HAR4 (32% de reducción entre CC y EH), B59 y R419 ambos con una disminución del 29% entre tratamientos (Anexo: tabla 4); siendo los genotipos con mayores diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos para esta variable (Anexo: tabla 6).

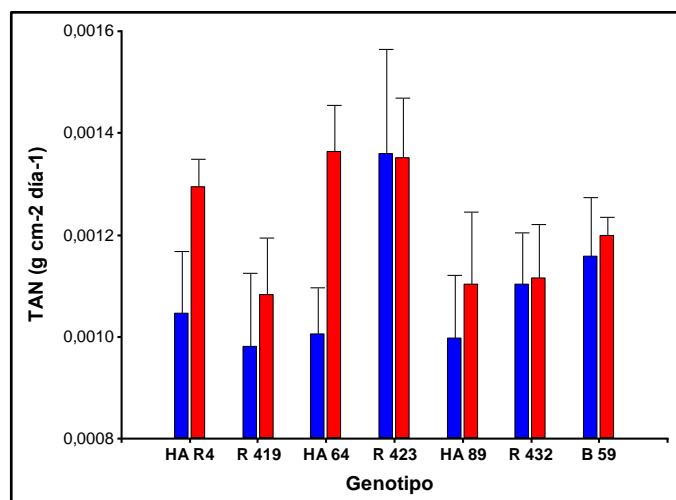


**Figura 16:** Transpiración total acumulada (g) para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo. Tratamiento **CC**: barras azules; tratamiento **EH**: barras rojas.

Para la variable tasa de asimilación neta (TAN) se observaron diferencias significativas entre genotipos y tratamientos ( $p < 0,0001$ ) y para la interacción ( $p = 0,0022$ ). El genotipo R423 se destacó por sobre los demás con un valor de  $\text{TAN} = 0,0014 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ , en contraposición a R419 que presentó el valor más bajo para dicha variable ( $\text{TAN} = 0,0010 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ) (Figura 17) (Anexo: tabla 2). Sin embargo, HA64 ( $p < 0,0001$ ) y HAR4 ( $p = 0,0006$ ) fueron los únicos que mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Anexo: tabla 7). Esto se evidenció en un aumento de TAN bajo estrés con respecto al CC de un 35% y 23%, respectivamente (Anexo: tabla 4). Sin

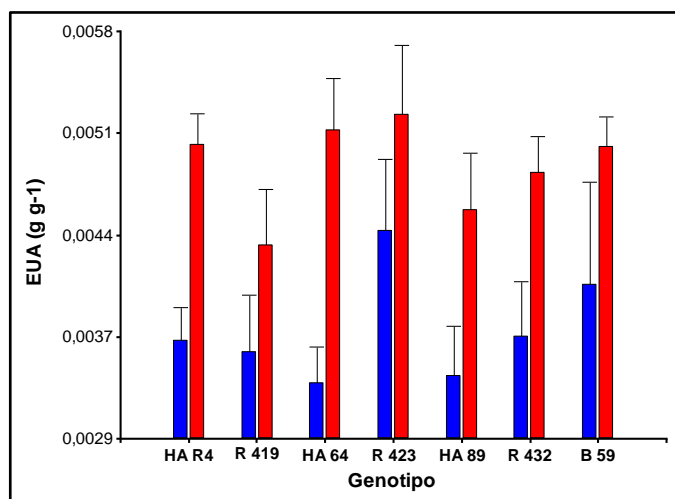


embargo, los demás genotipos no presentaron diferencias significativas entre CC y EH ( $p>0,05$ ) (Anexo: tabla 7).



**Figura 17:** Tasa de asimilación neta (TAN) ( $\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ) para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo. Tratamiento **CC**: barras azules; tratamiento **EH**: barras rojas.

Para la eficiencia en el uso del agua (EUA) el análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre genotipos ( $p=0,0011$ ) y tratamientos ( $p<0,0001$ ) (Figura 18), como así también para la interacción GxT ( $p=0,0264$ ). Los genotipos HA64 y HAR4 fueron los que presentaron mayores diferencias (55 y 39%, respectivamente) en la eficiencia del tratamiento estresado con respecto al control (Anexo: tabla 4). Sin embargo, R423 fue el genotipo que en promedio presentó la mayor eficiencia bajo estrés (EH:  $0,0053 \pm 0,0005 \text{ g g}^{-1}$ ) (Anexo: tabla 4). Por otro lado, los demás genotipos evidenciaron un aumento significativo ( $p<0,05$ ) entre 19 y 35% del tratamiento EH con respecto a CC (Anexo: tabla 8).



**Figura 18:** Eficiencia en el uso del agua (EUA) (g g<sup>-1</sup>) para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo. Tratamiento **CC**: barras azules; tratamiento **EH**: barras rojas.

Se determinó la relación lineal entre EUA y TAN durante los 16 días de estrés efectivo. El análisis de varianza mostró que existe una relación lineal entre ambas variables ( $p < 0,0001$ ) (Figura 19A). También se observa que el modelo propuesto no presenta falta de ajuste ( $p = 0,1990$ ). Así que, por cada aumento de TAN, EUA aumenta en promedio 3,52 g de materia seca/g agua transpirada. Por lo tanto, el modelo lineal es el siguiente:

$$\text{EUA} = 0,00023 + 3,52 * \text{TAN} \quad (R^2=0,60).$$

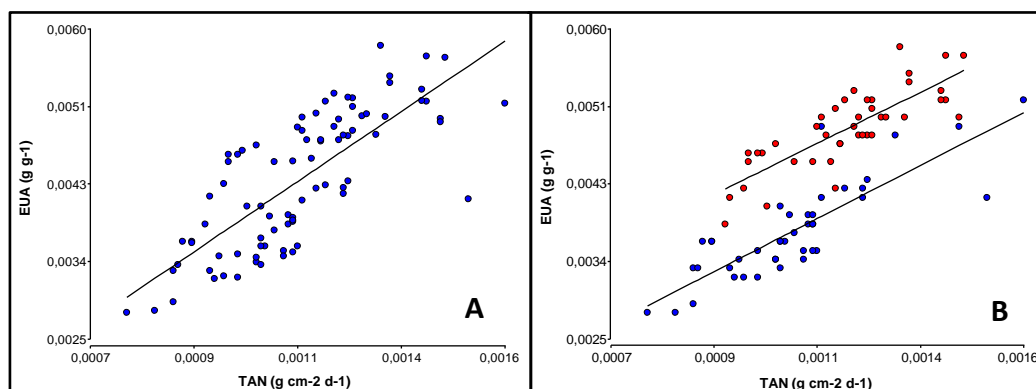
Si se considera por tratamiento se tienen los siguientes modelos para cada uno:

$$\text{EUA (CC)} = 0,0008 + 2,659 * \text{TAN} \quad (R^2=0,71).$$

$$\text{EUA (EH)} = 0,0018 + 2,566 * \text{TAN} \quad (R^2=0,67).$$

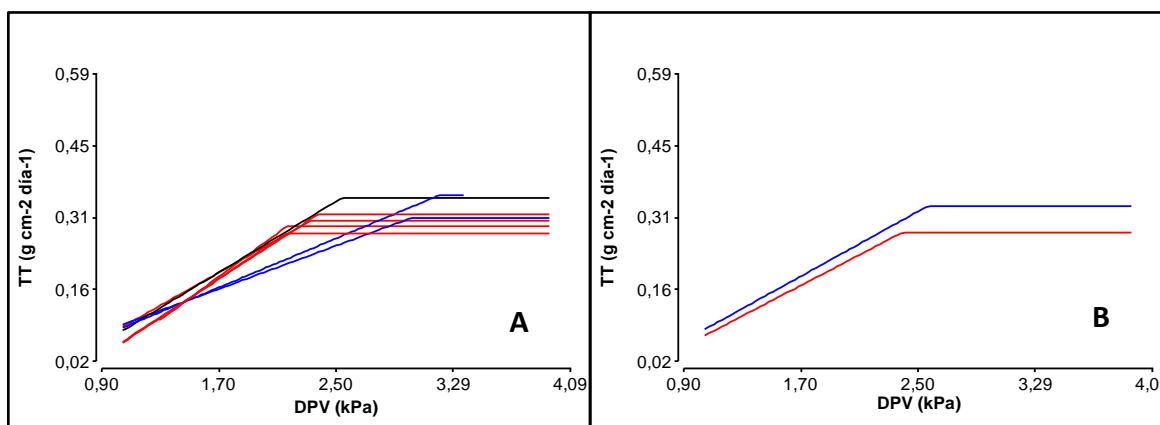
En este sentido, la figura 19B muestra que el tratamiento estresado presentó una mayor eficiencia que el control, para un mismo valor de TAN. En este caso se observa que las plantas a CC tienen mayor pendiente en comparación con las plantas bajo EH; sin embargo, para un mismo valor de  $\text{TAN} = 0,0011 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$  las que están a CC tienen menor eficiencia ( $\text{EUA} = 0,0037 \text{ g g}^{-1}$ ) que las plantas estresadas ( $\text{EUA} = 0,0046 \text{ g g}^{-1}$ ).





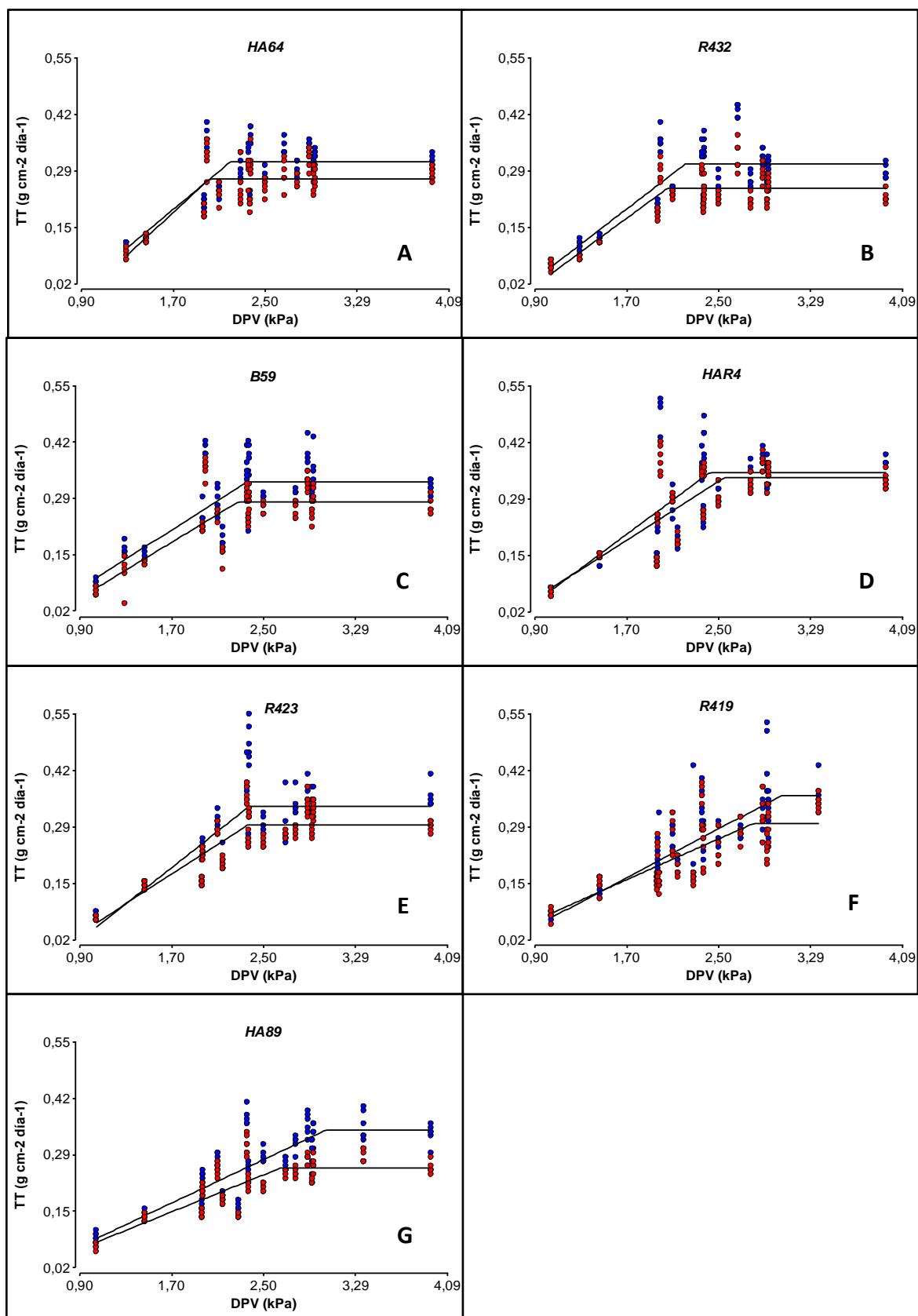
**Figura 19: A)** Relación lineal entre EUA y TAN para las siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos. **B)** Relación lineal particionada por tratamiento (**CC**: punto azul y **EH**: punto rojo) durante 16 días de estrés efectivo **EUA**: Eficiencia en el uso del agua ( $\text{g g}^{-1}$ ); **TAN**: Tasa de asimilación neta ( $\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ); **CC**: capacidad de campo; **EH**: estrés hídrico.

En el caso de la pendiente de la relación TT-DPV, solo se observaron diferencias significativas para genotipo ( $p < 0,0001$ ) y tratamiento ( $p = 0,0026$ ) (Figura 20). Los genotipos HA64 ( $0,21 \pm 0,05$ ) y R432 ( $0,20 \pm 0,02$ ) fueron los que presentaron una mayor pendiente (en rojo, Figura 20A) y R419 ( $0,13 \pm 0,02$ ) y HA89 ( $0,12 \pm 0,01$ ), los que mostraron una menor pendiente de la relación (en azul, Figura 20A) (Anexo: tabla 2). Entre CC y EH se determinó una disminución del 6% del tratamiento estresado con respecto al control (Figura 20B) (Anexo: tabla 3). Por otro lado, los únicos genotipos que mostraron diferencias entre tratamientos fueron R419 ( $p = 0,0480$ ) y R423 ( $p = 0,0111$ ) (Anexo: tabla 9); siendo este último el que evidenció mayor diferencia entre CC ( $0,21 \pm 0,01$ ) y EH ( $0,17 \pm 0,01$ ), con un 19% de reducción de la pendiente bajo estrés (Anexo: tabla 4). Por el contrario, HA64 no mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $p = 0,628$ ) (Anexo: tabla 9).



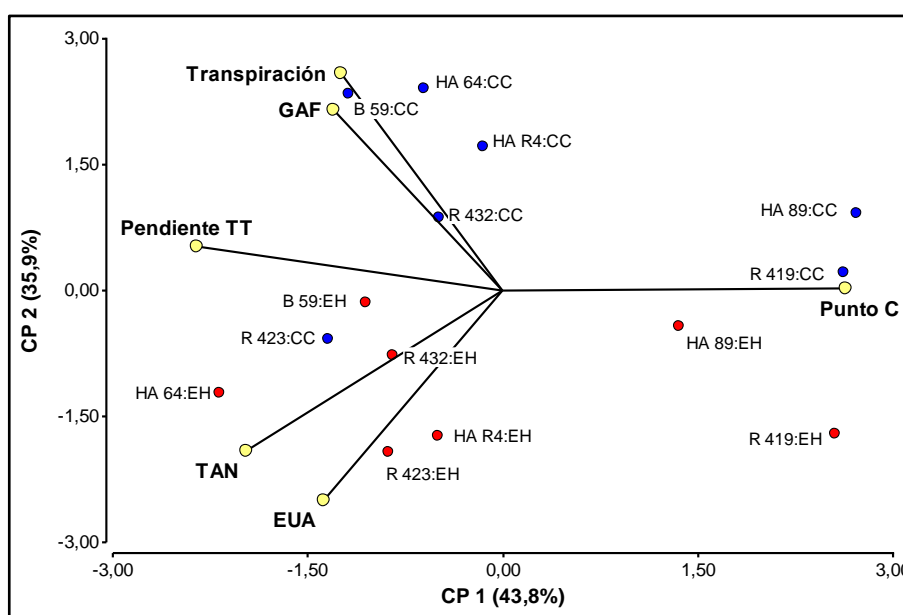
**Figura 20: A)** Relación entre TT diaria y DPV del día en siete líneas de girasol sometidos a dos condiciones hídricas (CC y EH) durante 16 días de estrés: pendientes en rojo (B59, HA64, R423 y R432); pendiente en negro (HAR4) y pendientes en azul (R419 y HA89). **B)** Relación entre TT diaria y DPV del día para dos condiciones hídricas (CC: pendiente en azul y EH: pendiente en rojo) durante los 16 días de estrés efectivo. **TT:** Tasa Transpiratoria ( $\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ); **DPV:** Déficit de Presión de Vapor (kPa); **CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico.

Para el punto de quiebre o punto C (valor de DPV por encima del cual la TT se mantiene constante alcanzando la  $TT_{\text{máx}}$ ), existen diferencias significativas para genotipos y tratamientos ( $p < 0,0001$ ), siendo significativa también la interacción GxT ( $p = 0,0021$ ). Es así que, HA64 y R432 al tener un punto C menor en ambos tratamientos, alcanzaron la  $TT_{\text{máx}}$  a un valor de DPV más bajo (Figuras 21A y 21B) mientras que, R419 y HA89 presentaron mayor valor para el punto C tanto en CC como en EH (Figuras 21F y 21G). Los genotipos B59 (Figura 21C), HAR4 (Figura 21D) y R423 (Figura 21E) presentaron valores intermedios para dicha variable en ambos tratamientos (Anexo: tabla 4). Por otro lado, sólo HA64 ( $p = 0,0493$ ), R432 ( $p = 0,0041$ ) y HA89 ( $p < 0,0001$ ) mostraron diferencias significativas entre tratamientos, siendo este último el que mostró la mayor diferencia entre CC y EH; con un 13% de reducción del tratamiento estresado con respecto al control para dicho genotipo (Anexo: tabla 4). Por otra parte, HAR4 no evidenció diferencias significativas entre tratamientos ( $p = 0,9067$ ), por lo tanto, bajo estrés mantuvo su  $TT_{\text{máx}}$  (Anexo: tabla 10). En la figura 21 se pueden observar las diferencias en la relación TT-DPV para cada genotipo durante el período vegetativo bajo dos regímenes hídricos (CC y EH).



**Figura 21:** Relación entre Tasa Transpiratoria diaria y Déficit de Presión de Vapor del día para cada una de las siete líneas de girasol sometidos a dos condiciones hídricas (CC: puntos en azul y EH: puntos en rojo) durante 16 días de estrés efectivo: **A)** HA64 **B)** R432 **C)** B59 **D)** HAR4 **E)** R423 **F)** R419 **G)** HA89. **TT:** Tasa Transpiratoria ( $\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ); **DPV:** Déficit de Presión de Vapor (kPa); **CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico.

El análisis de componentes principales (ACP) se realizó a partir de los datos agronómicos estandarizados y se consideraron las dos primeras componentes principales que explican el 80% de la variabilidad total observada en los datos (Figura 22). La CP1 explica la mayor variabilidad (43,8%) y muestra que las variables con mayor inercia son la pendiente y el punto C de la relación TT-DPV. Dichas variables separaron a HA89 y R419 de los demás genotipos tanto para CC como para EH, debido a que presentaron una menor pendiente y mayor punto C para dicha relación. Para la CP2 (35,9%), las variables con mayor peso resultaron la Transpiración y EUA, separando los genotipos del tratamiento CC de los del tratamiento EH; evidenciando que, las plantas bajo estrés transpiraron menos y fueron más conservadoras con el agua en los tejidos.



**Figura 22:** Gráfico biplot obtenido a partir del ACP. Ordenamiento producido por seis variables morfofisiológicas y ecofisiológicas de la media de los genotipos y tratamientos. **Pendiente TT:** Pendiente de la relación TT-DPV; **GAF:** Ganancia de Área Foliar; **Tta:** Transpiración total acumulada; **Punto C:** Punto de quiebre de la relación TT-DPV; **EUA:** Eficiencia en el Uso del Agua; **TAN:** Tasa de Asimilación Neta; **CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico; **CP1:** Componente Principal 1; **CP2:** Componente Principal 2.

En cuanto a la correlación entre variables, el ACP y el análisis de correlación de Pearson (Tabla 6) muestra una correlación positiva entre GAF y transpiración ( $p < 0,0001$ ). También se observó una alta correlación positiva entre TAN y EUA ( $p < 0,0001$ ); es por esto que, un aumento en TAN producirá un incremento en EUA, principalmente en genotipos bajo estrés. No así para la pendiente TT y el punto C que muestran una alta correlación negativa ( $p < 0,0001$ ).

**Tabla 6:** Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables analizadas y su significancia.

Variables	EUA	Pendiente TT	Punto C	Transpiración	GAF	TAN
<b>EUA</b>	1	0,957	0,003	0,004	0,975	<b>0,000</b>
<b>Pendiente TT</b>	-0,01	1	<b>0,000</b>	0,017	0,172	0,003
<b>Punto C</b>	-0,32	<b>-0,73*</b>	1	0,029	0,022	0,001
<b>Transpiración</b>	-0,32	0,26	-0,24	1	<b>0,000</b>	0,292
<b>GAF</b>	0,00	0,15	-0,25	<b>0,60*</b>	1	0,786
<b>TAN</b>	<b>0,77*</b>	0,32	-0,36	-0,12	0,03	1

**Coeficiente de correlación (r):** diagonal inferior; **p-valor:** diagonal superior. \* Correlación significativa al 5%.

**EUA:** Eficiencia en el uso del agua; **GAF:** ganancia de área foliar; **TAN:** tasa de asimilación neta.

Teniendo en cuenta los resultados hallados en la caracterización fenotípica en invernáculo, se clasificó a los genotipos evaluados como de eficiencia transpiratoria (ET) alta (HA64 y HAR4), intermedia (B59, R423 y R432) y baja (HA89 y R419). Las líneas HAR4 (alta ET) y R419 (baja ET) mostraron el mismo comportamiento frente al estrés hídrico tanto en el ensayo de invernáculo como en el ensayo a campo; manteniendo la eficiencia de cada genotipo tanto en el estadio vegetativo como durante el estadio reproductivo.

## 8.2. Caracterización genotípica de las líneas parentales

Con el objetivo de genotipificar las siete líneas de girasol se realizó una caracterización con 127 marcadores SSR (116 gSSR y 11 EST-SSR), de los cuales, 94 amplificaron en todas las líneas mostrando polimorfismo entre ellas (Tabla 7). De los 33 marcadores restantes, uno mostró duplicación, tres fueron heterocigotas, diez monomórficos, dos multilocus y 17 no amplificaron en ninguna de las líneas; pese a modificar las condiciones de amplificación y ciclado (Anexo: tabla 1). De los 94 marcadores que amplificaron, el 78% presentaron entre dos y tres alelos; mientras que solo un marcador logró diferenciar hasta seis alelos (HA4011) (Tabla 7). Esta caracterización permitió detectar un nivel de polimorfismo entre 46 y 64% entre las posibles combinaciones de

parentales teniendo en cuenta su comportamiento frente al estrés en campo e invernáculo (Tabla 8).

**Tabla 7:** Número de alelos detectados por los marcadores analizados.

N° alelos/ <i>locus</i>	N° marcadores
6	1
5	6
4	13
3	31
2	43
<b>Total</b>	<b>94</b>

**Tabla 8:** Nivel de polimorfismo detectado entre las posibles combinaciones de parentales para 94 marcadores SSR.

Combinación de parentales		Comportamiento	Comportamiento frente	Nivel de
Parental femenino	Parental masculino	frente al EH en campo	al EH en invernáculo	
B59	R432	S x T	EI x EI	58%
B59	R423	S x I	EI x EI	54%
R423	R419	I x S	EI x EB	46%
R419	R423	S x I	EB x EI	46%
R419	R432	S x T	EB x EI	64%
R419	HA64	S x T	EB x EA	59%
R419	HAR4	S x T	EB x EA	59%
HA89	HAR4	I x T	EB x EA	60%
HA89	HA64	I x T	EB x EA	43%

EH: estrés hídrico; S: susceptible; I: comportamiento intermedio; T: tolerante; EB: eficiencia baja; EI: eficiencia intermedia; EA: eficiencia alta.

Para determinar la variabilidad genética presente en el conjunto de marcadores utilizados se eliminaron tres marcadores que mostraron más del 30% de dato faltante. Es así que, se identificaron un total de 262 alelos para los 91 *loci* analizados, para los cuales se encontraron 26 alelos nulos con una frecuencia igual a 0,099. La tabla 9 muestra la riqueza alélica y la diversidad genética encontrada para estos marcadores analizados. Si bien el número de alelos detectados es alto, se obtuvo un 47% de marcadores que solo amplificaron dos alelos, por lo que el número de alelos promedios por *locus* fue 2,88 (Tabla 7 y 9). Por otro lado, se identificaron 21 marcadores SSR altamente polimórficos con un  $PIC \geq 0,57$ , de los cuales 19 son gSSR y dos EST-SSR y han

permitido discriminar entre cuatro y seis alelos. Entre estos, el marcador HA4011 fue el que presentó el mayor número de alelos y, por ende, resultó ser el más polimórfico ( $PIC=0,79$ ) (Anexo: tabla 11). En la Tabla 10 se puede observar la riqueza alélica y la diversidad genética encontrada para los gSSR e EST-SSR por separado, donde se evidencia una reducción de las medidas de diversidad estimadas para estos últimos con respecto a los gSSR.

**Tabla 9:** Medidas de diversidad genética por *locus*.

Diversidad Genética	Valor Promedio
<b>Na</b>	2,88
<b>Ne</b>	2,34
<b>D</b>	0,52
<b>He</b>	0,56
<b>PIC</b>	0,46

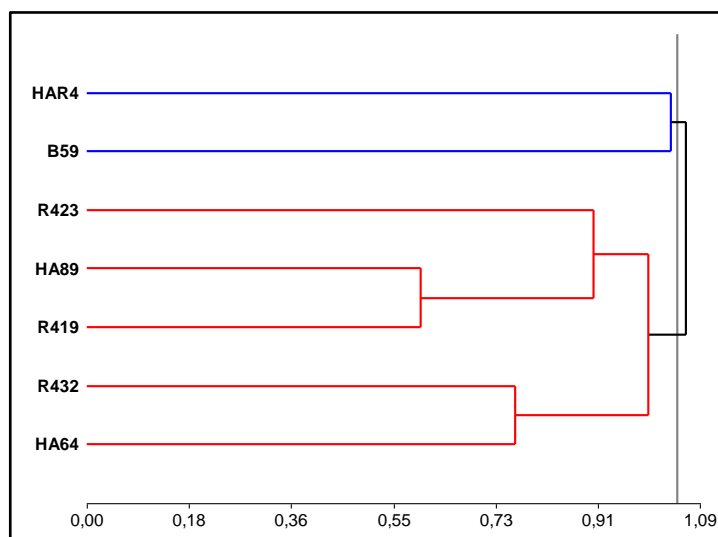
**Na:** número promedio de alelos por *locus*; **Ne:** número efectivo promedio de alelos por *locus*; **D:** Índice de Diversidad Genética; **He:** Heterocigosidad Inssegada de Nei; **PIC:** Contenido de Información Polimórfica.

**Tabla 10:** Medidas de diversidad genética por tipo de marcador.

Tipo marcador	N	Na	Ne	D	He	PIC
<b>gSSR</b>	80	2,91	2,37	0,52	0,57	0,46
<b>EST-SSR</b>	11	2,64	2,08	0,50	0,54	0,42

**N:** número de marcadores analizados; **Na:** número promedio de alelos por *locus*; **Ne:** número efectivo promedio de alelos por *locus*; **D:** Índice de Diversidad Genética; **He:** Heterocigosidad Inssegada de Nei; **PIC:** Contenido de Información Polimórfica. **gSSR:** *genomic Simple Sequence Repeats*; **EST-SSR:** *Expressed Sequence Tags-Simple Sequence Repeats*.

Con el fin de determinar la relación genética entre las siete líneas estudiadas se realizó un análisis de conglomerados a partir de los 91 marcadores SSR. En la figura 23 se observa el dendrograma obtenido a partir de dicho análisis mediante la distancia de Nei *Standard* (Nei, 1972). Si se realiza un corte a una distancia igual a 1,05 de la distancia total, se pueden identificar dos grupos bien definidos, quedando HAR4 y B59 en uno (grupo azul) y los demás genotipos en el otro (grupo rojo). Dentro de este segundo grupo se formaron dos subgrupos (nodo: 0,95), uno conformado por R423, HA89 y R419 y otro por R432 y HA64.



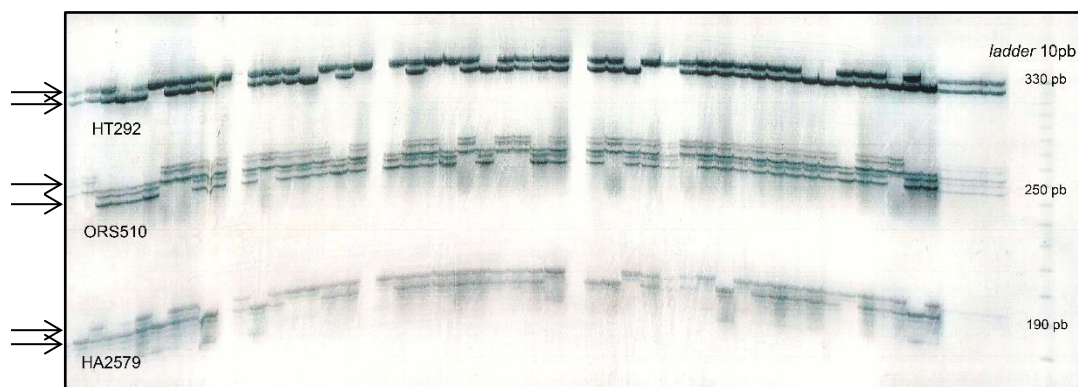
**Figura 23:** Dendrograma UPGMA calculado a partir de la distancia de Nei *Standard* para las siete líneas parentales de girasol con base en 91 marcadores SSR. Coeficiente de correlación cofenética: 0,71.

Si bien el número de posibles cruzamientos entre parentales susceptibles y tolerantes asciende a nueve (Tabla 8), al momento de comenzar con el desarrollo de la presente tesis de maestría solo se disponían las siguientes poblaciones: B59xR432, B59xR423, R423xR419, R419xR423 y R419xR432; no así de las demás combinaciones de parentales como R419xHA64 y HA89xHAR4 que fueron generadas al finalizar el presente trabajo.

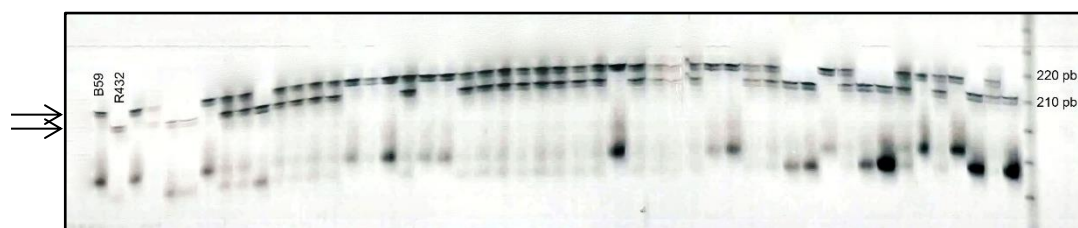
### 8.3. Caracterización genotípica de las poblaciones $F_2$ y análisis de segregación de marcadores

Un total de 70 individuos por cada una de las cinco poblaciones  $F_2$  se genotipificaron con 34 marcadores SSR polimórficos seleccionados para cada cruzamiento, a partir de los datos obtenidos de la caracterización molecular de las líneas parentales (Anexo: tablas 12 a 16). En la figura 24 se observan los resultados obtenidos de una corrida electroforética para una PCR *multiplex* con tres cebadores (HT292, ORS510 y HA2579) para la población B59xR432. Los cebadores que no pudieron incorporarse a ninguna PCR *multiplex* se corrieron solos en el gel de poliacrilamida como se muestra en la figura 25.





**Figura 24:** Imagen obtenida de una corrida electroforética en gel de poliacrilamida 6% (p/v) de una PCR *multiplex* con tres marcadores (HT292, ORS510 y HA2579). Los alelos se indican con flechas. **pb:** pares de bases. **Ladder 10 pb:** marcador de peso molecular.



**Figura 25:** Imagen obtenida de una corrida electroforética en gel de poliacrilamida 6% (p/v) del marcador HA4057 en la población B59xR432. Los alelos se indican con flechas. **pb:** pares de bases.

Con la finalidad de determinar si los marcadores seleccionados para la genotipificación presentaban segregación mendeliana esperada (1:2:1) para una población  $F_2$ , se realizó el análisis de segregación de los 34 marcadores SSR para cada población (Anexo: tablas 12 a 16). En dichas tablas se muestran los valores de  $\chi^2$  obtenidos para cada una de las cinco poblaciones. Es así que, para un 10% de dato faltante y un valor crítico de  $\chi^2=5,991$  ( $\alpha=0,05$ ), se observó distorsión de la segregación en las cinco poblaciones  $F_2$  analizadas. Para R423xR419 se vio una fuerte distorsión de la segregación respecto a la proporción genotípica esperada (1:2:1) para todos los *loci*, con el 100% de los individuos distorsionados hacia el parental femenino R423 (Anexo: tabla 14). Las cuatro poblaciones restantes evidenciaron un número variable de marcadores distorsionados que presentaron una desviación de la segregación hacia el alelo materno (Tabla 11: superíndice <sup>a</sup>), hacia el alelo paterno (Tabla 11: superíndice <sup>b</sup>) y un exceso de heterocigotas (Tabla 11: superíndice <sup>c</sup>).

**Tabla 11:** Lista de marcadores distorsionados en cuatro de las cinco poblaciones (valores expresados en porcentaje).

Población F <sub>2</sub>	Marcador	GL	$\chi^2_{1:2:1}$	A%	H%	B%
<b>B59xR432</b>	<b>HA2905</b>		234,00	100 <sup>a</sup>	0	0
	<b>HA920</b>	10	112,56	26	0	74 <sup>b</sup>
	<b>ORS316</b>	13	11,26	9	65 <sup>c</sup>	26
<b>B59xR423</b>	<b>HA1402</b>	17	8,92	39 <sup>a</sup>	43	17
	<b>HA2053</b>	9	18,53	32	26	42 <sup>b</sup>
	<b>HA2178</b>		20,55	14	32	55 <sup>b</sup>
	<b>HA3627</b>	5	10,18	12	67 <sup>c</sup>	21
	<b>ORS1041</b>	7	6,33	24	39	38 <sup>b</sup>
	<b>ORS297</b>	17	8,63	32 <sup>a</sup>	58	11
	<b>ORS371</b>	1	6,15	16	64 <sup>c</sup>	19
<b>R419xR423</b>	<b>HA4011</b>	13	15,72	44 <sup>a</sup>	32	24
	<b>HT761</b>	2	104,77	25	3	73 <sup>b</sup>
	<b>HT974</b>	1	110,11	26	0	74 <sup>b</sup>
	<b>ORS297</b>	17	13,15	46 <sup>a</sup>	24	29
	<b>ORS959</b>	1	116,29	76 <sup>a</sup>	1	22
<b>R419xR432</b>	<b>HA2053</b>	9	9,73	33	30	37 <sup>b</sup>
	<b>HA2579</b>	10	213,00	100 <sup>a</sup>	0	0
	<b>HA3555</b>	12	94,31	25	4	71 <sup>b</sup>
	<b>HT974</b>	1	223,10	1	0	99 <sup>b</sup>
	<b>ORS613</b>	10	228,00	100 <sup>a</sup>	0	0

**GL:** Grupo de Ligamiento;  $\chi^2_{1:2:1}$ : Chi-cuadrado ( $\alpha=0,05$ ); **A%:** porcentaje de individuos con el alelo A; **H%:** porcentaje de individuos heterocigotas; **B%:** porcentaje de individuos con el alelo B. <sup>a</sup> cebadores con distorsión para el alelo A; <sup>b</sup> cebadores con distorsión para el alelo B; <sup>c</sup> cebadores con distorsión para el heterocigota.

Con el objetivo de determinar el tipo de selección que subyace dicha distorsión, se realizó una prueba  $\chi^2$  para las frecuencias alélicas y genotípicas (Tabla 12). De los 17 marcadores analizados en cuatro de las cinco poblaciones, cinco presentaron distorsión significativa de la segregación alélica solamente ( $\chi^2_c=3,841$ ;  $\alpha=0,05$ ); tres de ellos exhibieron distorsión de las frecuencias genotípicas ( $\chi^2_c=5,991$ ;  $\alpha=0,05$ ) y los siete restantes mostraron distorsión de las frecuencias alélicas y genotípicas. ORS 297 fue el único marcador que presentó distorsión de la frecuencia alélica en la población B59xR423 y de la frecuencia genotípica en el cruzamiento R419xR423; los demás marcadores que se repiten (HA2053 y HT974) en el análisis evidenciaron el mismo tipo de distorsión en las dos poblaciones en las que se genotipificaron. Por otro lado, ORS 1041 fue el único marcador que no presentó distorsión para ninguna de las dos frecuencias.

**Tabla 12:** Resultados del análisis de distorsión de las frecuencias alélicas y genotípicas para 17 marcadores analizados.

Población	Marcador	Frecuencias alélicas		$\chi^2$	
		p	q	p=q	p2:2pq:q2
B59xR432	HA2905	1,00	0,00	156,00*	0,00
	HA920	0,26	0,74	35,56*	77,00*
	ORS316	0,42	0,58	4,39*	8,73*
B59xR423	HA1402	0,61	0,39	7,61*	0,56
	HA2053	0,45	0,55	1,75	16,34*
	HA2178	0,30	0,70	14,73*	2,45
	HA3627	0,45	0,55	1,29	9,50*
	ORS1041	0,43	0,57	2,78	3,33
	ORS297	0,61	0,39	6,74*	3,40
	ORS371	0,49	0,51	0,11	6,08*
R419xR423	HA4011	0,60	0,40	6,00*	8,33*
	HT761	0,26	0,74	35,56*	66,95*
	HT974	0,26	0,74	34,11*	76,00*
	ORS297	0,59	0,41	2,39	10,15*
	ORS959	0,77	0,23	44,24*	70,46*
R419xR432	HA2053	0,48	0,52	0,13	9,57*
	HA2579	1,00	0,00	142,00*	0,00
	HA3555	0,27	0,73	30,83*	60,66*
	HT974	0,01	0,99	146,10*	77,00*
	ORS613	1,00	0,00	152,00*	0,00

p: alelo A. q: alelo B.  $\chi^2$ : Chi cuadrado. \*: significativo al 5% ( $\alpha=0,05$ ).

#### 8.4. Selección de una población $F_2$ segregante apta para el desarrollo de un mapa de ligamiento de marcadores

A partir de los datos fenotípicos y genotípicos de las líneas parentales y del análisis de segregación de los marcadores en las distintas poblaciones segregantes, se seleccionó aquella población  $F_2$  con el menor número de marcadores distorsionados y cuyas líneas parentales presentaron mayor nivel de polimorfismo, mayor distancia genética entre ellas y las mayores diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ) para las variables fenotípicas evaluadas (Tabla 13).

**Tabla 13:** Resumen de la caracterización fenotípica y molecular de las cuatro líneas parentales y de las cinco poblaciones segregantes F<sub>2</sub>.

Combinación de parentales	Comportamiento fenotípico frente al EH en invernáculo		Nivel de polimorfismo entre líneas (%)	Porcentaje de marcadores distorsionados (%)	Distancia genética de Nei <i>Standard</i>
	Parental femenino	Parental masculino			
<b>B59 y R432</b>	EI	EI	57,5	9	0,94
<b>B59 y R423</b>	EI	EI	54	21	1,19
<b>R423 y R419</b>	EI	EB	46	100	0,81
<b>R419 y R423</b>	EB	EI	46	15	0,81
<b>R419 y R432</b>	EB	EI	64	15	1,29

**EH:** estrés hídrico; **EI:** Eficiencia transpiratoria intermedia; **EB:** Eficiencia transpiratoria baja.

Debido a que B59 presentó una eficiencia transpiratoria intermedia en la evaluación en invernáculo y en el campo se comportó como susceptible al estrés hídrico, las poblaciones F<sub>2</sub> provenientes del cruzamiento de esta línea con otro parental, por el momento no fueron consideradas como posibles poblaciones de mapeo. En cuanto a la población R423xR419 se la descartó debido al alto porcentaje de distorsión que presentó en la caracterización molecular. Por otro lado, las poblaciones R419xR423 y R419xR432 mostraron el mismo porcentaje de marcadores distorsionados (15%). Sin embargo, debido a que R419 y R423 se ubicaron en el mismo subgrupo en el dendrograma, no serían parentales propicios debido a la estrecha relación genética que presentaron y al bajo porcentaje de marcadores polimórficos (Tabla 13). Por consiguiente, la población elegida fue la que resultó del cruzamiento entre R419 y R432, ya que mostró mayor polimorfismo entre las líneas (64%) y sólo un 15% de distorsión en la segregación de marcadores; además, se ubicaron en subgrupos distintos del dendrograma y mostraron un comportamiento diferencial frente al estrés hídrico.

## 9. DISCUSIÓN

El girasol es uno de los cultivos oleaginosos más importantes a nivel mundial ya que su aceite ocupa el cuarto lugar en producción entre los principales aceites vegetales. En este sentido, Argentina es el cuarto productor con 7,3% de la producción mundial de aceite (USDA, 2017). Sin embargo, con el avance de los cultivos extensivos, el cultivo de girasol se desplazó hacia zonas marginales, caracterizadas por un déficit hídrico marcado. Por consiguiente, resulta interesante explorar los recursos genéticos de la especie para identificar regiones genómicas asociadas a dicha tolerancia. Es por ello que, con el objetivo de seleccionar una población de mapeo  $F_2$  de girasol cultivado adecuada para el desarrollo de un mapa de ligamiento se realizó una caracterización fenotípica de siete líneas parentales y un análisis molecular con marcadores SSR de estas líneas y cinco poblaciones  $F_2$  generadas a partir de dichas líneas.

Para ello, la selección de las líneas endocriadas de girasol cultivado analizadas en la presente tesis se realizó con base en las evaluaciones previas realizadas en el campo por el Grupo de Mejoramiento en Girasol (Andrade *et al.*, 2009). Dicha caracterización se realizó bajo dos regímenes hídricos: en secano y bajo riego. Las variables agronómicas analizadas en ese ensayo fueron altura de planta, peso de 1000 semillas, número de semillas por capítulo, rendimiento en aceite  $\text{Kg ha}^{-1}$  y rendimiento en semilla  $\text{Kg ha}^{-1}$ . Así mismo, se determinó el porcentaje de germinación relativo (PGR) en manitol (200 y 400 mM) en cámara de crecimiento para determinar el comportamiento de las plántulas frente al estrés hídrico durante la germinación. Es así que, los autores sólo observaron diferencias significativas para las variables rendimiento en aceite  $\text{Kg ha}^{-1}$ , en semilla  $\text{Kg ha}^{-1}$  y para PGR. Por lo que, la clasificación de las líneas se realizó con base en dichas variables. Por lo tanto, las líneas B59 y R419 fueron clasificadas como susceptibles a la sequía y a R432 y HAR4 como tolerantes, mientras que HA89 y R423 mostraron un comportamiento intermedio frente al estrés. Por su parte, el genotipo HA64 no fue evaluado en ese ensayo, sin embargo, está clasificado como tolerante al estrés hídrico por Pereyra-Irujo *et al.* (2007) en un ensayo para estudiar la variabilidad genética en la expansión foliar bajo estrés.

Con el fin de caracterizar fenotípicamente estas siete líneas en invernáculo, se realizó un ensayo durante el período vegetativo para determinar su comportamiento frente al estrés hídrico. Es así que, los resultados obtenidos en esta evaluación muestran que existe una gran variabilidad genotípica de respuesta al estrés hídrico en cuanto a los caracteres evaluados y al nivel de estrés

aplicado. La ventaja de realizar ensayos en invernáculo es que se puede tener un mayor control de algunas variables climáticas y de cuestiones de manejo como el régimen hídrico aplicado. Sin embargo, hay que tener cuidado a la hora de extrapolar los resultados al campo. Es por ello que, se recomienda también realizar evaluaciones en dicha condición para elaborar una idea más acabada de las bases ecofisiológicas que gobiernan el carácter en estudio (Casadebaig *et al.*, 2008; Velázquez *et al.*, 2017).

A partir de los datos fenotípicos obtenidos del ensayo en invernáculo, se pudo detectar diferencias significativas entre genotipos y entre tratamientos para todas las variables evaluadas; además de encontrar interacción genotipo por tratamiento significativa para la tasa de asimilación neta (TAN), la eficiencia en el uso del agua (EUA) y el punto C. Así que, se observó una reducción de la ganancia de área foliar (GAF) en un 18% entre tratamientos, como así también una disminución de la transpiración del tratamiento estresado con respecto al control en un 23%. Dicha asociación quedó en evidencia por la alta correlación positiva encontrada entre dichas variables ( $r=0,60$ ,  $p<0,0001$ ). Así mismo, esta relación también fue observada por Pereyra-Irujo *et al.* (2007), quienes determinaron que la tasa de consumo hídrico depende ampliamente del área foliar de cada genotipo. Por lo tanto, bajo estrés se produce una reducción en el volumen de agua transpirada como consecuencia de la disminución en el área foliar total de la planta (Golberg, 2008). En este sentido, HA64 fue el único genotipo que mostró una reducción significativa del área foliar del tratamiento estresado en 27% y en consecuencia una reducción en la transpiración del 18%. De igual manera, Pereyra-Irujo *et al.* (2008) encontraron variabilidad para la expansión foliar entre los genotipos que analizaron, sugiriendo que las plantas que presentaron mayor reducción en la tasa de expansión presentaban un alto ajuste osmótico (AOs). Estos resultados concuerdan con los hallados por Chimenti y Hall (1994), quienes observaron que genotipos de girasol con alto AO mostraron menor expansión foliar. Es así que, concluyen que existe una asociación negativa entre estas variables, probablemente debido a que la reducción en la expansión foliar, es uno de los mecanismos más importantes para restringir la pérdida de agua por deshidratación.

Por otro lado, la reducción significativa de la transpiración entre control y estrés, como consecuencia de una menor GAF, se hizo evidente entre los tratamientos de las líneas HAR4, B59 y R419, siendo los genotipos con mayores diferencias significativas para esta variable ( $p<0,05$ ). Si bien, la expansión foliar es el primer proceso morfofisiológico afectado por el estrés (Connor y Jones, 1985) debido a la reducción en la división y en la expansión celular (Pereyra-

Irujo *et al.*, 2008), también se vería afectada la conductancia de la hoja por cierre estomático. Dicho mecanismo es una de las principales causas de disminución en la transpiración bajo una situación de estrés; ya que, al haber una reducción del potencial hídrico de la hoja disminuye dicha conductancia evitando la pérdida excesiva de vapor de agua (Hsiao, 1973). Así mismo, Nardini y Salleo (2005) reportaron que la apertura estomática se reducía entre 28 y 50% cuando el estrés aumentaba de moderado a severo, respectivamente.

La tasa de asimilación neta (TAN) es un índice que mide la eficiencia fotosintética promedio y mide la ganancia neta de asimilados por unidad de área foliar y unidad de tiempo (Morales-Morales *et al.*, 2015). Dicha variable alcanza valores máximos en los primeros estadios fenológicos para luego disminuir debido al incremento de materia seca no fotosintetizante; por el aumento de la senescencia foliar a medida que avanza el desarrollo fenológico de la planta y por la translocación de los fotoasimilados a los diferentes órganos reproductivos. Dicha eficiencia se ve modificada por la temperatura que afecta tanto a la fotosíntesis como a la respiración, por la disminución de la concentración de dióxido de carbono que produce una reducción de la actividad fotosintética y, además, por la eficiencia de interceptación de la radiación que depende del índice de área foliar y la arquitectura de la planta (Anónimo, s.f.). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un aumento en TAN del tratamiento estresado con respecto al control, lo cual indicaría que las plantas bajo estrés aumentaron su eficiencia fotosintética a pesar de la reducción en GAF. Así pues, los únicos genotipos que mostraron diferencias significativas entre tratamientos fueron HA64 y HAR4; los cuales evidenciaron un aumento de TAN bajo estrés de 35% y 23%, respectivamente. Esto se podría explicar de acuerdo a lo reportado por Velázquez *et al.* (2017), quienes observaron un aumento bajo estrés del número de estomas por unidad de área foliar (75% más en HA64); en cambio, no observaron que el estrés afecte significativamente la eficiencia fotosintética del fotosistema II. Por lo tanto, esto mantendría activa la fotosíntesis sin verse afectada la acumulación de biomasa.

Por su parte, la eficiencia en el uso del agua (EUA) se define como la biomasa producida por unidad de agua transpirada y expresa la eficiencia con la cual un cultivo fija el CO<sub>2</sub> en relación con el agua que pierde (Dardanelli *et al.*, 2003). Prieto *et al.* (2007, 2011) demostraron que EUA es un carácter de naturaleza constitutiva que presenta variabilidad intraespecífica y que aumenta en respuesta al déficit hídrico durante la fase vegetativa en soja. Es por ello que, esta variable ha sido considerada como criterio de selección por su asociación con la tolerancia al estrés hídrico

en otros cultivos tales como trigo, cebada y soja (Condon *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2007). En este sentido, los resultados del presente trabajo mostraron diferencias significativas entre tratamientos con un aumento de la eficiencia bajo estrés del 32% ( $p < 0,0001$ ). Por consiguiente, las plantas estresadas fueron más eficientes y conservadoras con el agua disponible en el suelo, produciendo mayor cantidad de materia seca por gramo de agua transpirada; de modo similar a lo observado por Prieto *et al.* (2011) en soja durante la fase vegetativa. En el presente trabajo también se observó gran variabilidad genotípica para la EUA durante el estadio vegetativo, siendo las líneas HA64 y HAR4 las que presentaron mayores diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre CC y EH. Esta diferencia entre tratamientos, también fue observada por Velázquez *et al.* (2017) quienes detectaron entre 15 y 30% de aumento en la eficiencia bajo estrés en girasol durante el estadio vegetativo.

La tasa transpiratoria (TT) se define como la cantidad de agua transpirada por unidad de superficie foliar y por unidad de tiempo. Dicha tasa depende directamente del gradiente de concentración de vapor de agua (estimado a partir del Déficit de Presión de Vapor o DPV) entre la cavidad subestomática y el aire que rodea a la hoja (Tanner *et al.*, 1983). A medida que el DPV aumenta, la TT también aumenta; sin embargo, este incremento no es ilimitado ya que la TT alcanza un máximo ( $TT_{\text{máx}}$ ) por encima de un valor umbral de DPV o Punto C (Turner *et al.*, 1984). Por todo esto, con el objetivo de establecer la relación entre TT diaria y DPV durante el período vegetativo y bajo dos regímenes hídricos en girasol cultivado, se determinó dicha función a partir de la relación no lineal *Plateau*. En consecuencia, bajo estrés todos los genotipos redujeron la pendiente de dicha relación en promedio un 6%, lo cual revela que bajo estas condiciones los genotipos reducen la  $TT_{\text{máx}}$ . Por otro lado, los únicos genotipos que mostraron diferencias significativas en la pendiente entre tratamientos fueron R419 y R423, probablemente debido a que el estrés alcanzado no fue tan severo como para detectar mayores diferencias entre los tratamientos de los demás genotipos analizados.

No obstante, el punto de quiebre o punto C de la relación también se redujo bajo estrés en promedio un 5%, disminuyendo así la  $TT_{\text{máx}}$  alcanzada por cada línea. Es decir, que los genotipos que presentaron mayor pendiente, mostraron menor punto C (HA64 y R432) y los que mostraron menor pendiente evidenciaron mayor punto C (R419 y HA89). Por esto, los dos primeros genotipos que alcanzaron la  $TT_{\text{máx}}$  a un valor de DPV más bajo, redujeron la conductancia estomática y en consecuencia la transpiración. En cambio, R419 y HA89 alcanzaron su  $TT_{\text{máx}}$  a un DPV más alto, probablemente debido a que sus estomas presentarían menor sensibilidad al



déficit hídrico (Turner *et al.*, 1985). Por otro lado, HAR4 presentó una de las  $TT_{\text{máx}}$  más altas en comparación con los demás genotipos; no obstante, dicha tasa la alcanzó a un valor de DPV igual a 2,46 kPa. Si bien la tasa fotosintética es proporcional a la TT (Tanner *et al.*, 1983), esta podría ser mayor en momentos del día donde el DPV es menor a 2,46 kPa. En este sentido, la significancia práctica de la relación TT-DPV es que a un valor de DPV por encima del punto C (específico para cada genotipo) se produciría una reducción en la TT por aumento de la sensibilidad estomática; lo cual resultaría en la conservación del agua en los tejidos. De modo que, los resultados del presente trabajo contribuyen a demostrar la existencia de diferencias significativas entre genotipos para esta relación en condiciones de limitación hídrica durante el estadio vegetativo en girasol.

Por otro lado, según Sinclair *et al.* (2008), el punto C resultaría de una conductancia hidráulica (K) limitada en la hoja que restringe el flujo de agua desde el xilema a las células oclusivas, bajo condiciones de alta demanda evaporativa (por ejemplo, DPV alto). Se entiende por K, la capacidad del xilema para conducir el agua desde la raíz hasta las hojas. Esto llevaría a una pérdida de turgencia en las células oclusivas y, en consecuencia, a una disminución de la conductancia estomática (Turner *et al.*, 1985; Nardini y Salleo, 2005). En este sentido, Sadok y Sinclair (2010) y Nardini *et al.* (2005), determinaron que la reducción de la conductancia hidráulica se asociaría a la merma en la expresión o actividad de las acuaporinas sensibles a nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en soja y a cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) en girasol. Por lo tanto, dichos autores sugieren que, en ausencia de estas proteínas, el flujo de agua podría restringirse causando que la TT alcance un máximo y se mantenga estable a un DPV alto.

El ACP explicó el 80% de la variabilidad total observada, siendo la CP1 la componente que explicó la mayor variabilidad (43,8%) y separó a HA89 y R419 de los demás genotipos como los que presentaron menor pendiente y mayor punto C, tanto para CC como para EH. Esta alta correlación negativa entre estas variables ( $r=-0,73$ ,  $p<0,0001$ ), también fue reportada por Gholipoor *et al.* (2010) en sorgo. A su vez, las variables con mayor peso para la CP2 (Transpiración y EUA), la cual explicó un 35,9% de la variabilidad total, discriminaron a los genotipos por tratamiento, separando el control del estresado. Esto tiene relación con la mayor EUA para los genotipos bajo estrés, que requirieron menor cantidad de agua para producir 1 g de materia seca. Esta correlación negativa entre EUA y transpiración ( $r=-0,32$ ,  $p=0,004$ ) también fue observada por Adiredjo *et al.* (2014a, 2014b) y Velázquez *et al.* (2017); ya que una mayor transpiración reduciría la eficiencia. Dado que, HA89 y R419 fueron los que mostraron menor

EUA y menor TAN, se los podría clasificar como genotipos de baja eficiencia transpiratoria (ET) y fotosintética. No así los demás genotipos que presentaron un nivel de eficiencia intermedia-alta. Por otro lado, la alta correlación positiva entre TAN y EUA ( $r=0,77$ ,  $p<0,0001$ ), también se hizo evidente con la relación lineal positiva entre ambas variables ( $R^2=0,60$ ,  $p<0,0001$ ).

Teniendo en cuenta los resultados hallados a partir de la evaluación en invernáculo durante el periodo vegetativo, se podría clasificar a los genotipos evaluados como de eficiencia transpiratoria alta (HA64 y HAR4), intermedia (B59, R423 y R432) y baja (HA89 y R419). A partir de estos resultados y los de Andrade *et al.* (2009), se observó que R419 y HAR4 tienen el mismo comportamiento frente al estrés hídrico tanto en el ensayo de invernáculo como en la evaluación a campo; lo cual permitió concluir que cada genotipo, mantiene así su eficiencia transpiratoria tanto en el estadio vegetativo como en el estadio reproductivo. Sin embargo, B59 y R432 mostraron una eficiencia transpiratoria intermedia en invernáculo, en contraposición a lo que se observó en la evaluación a campo realizada por Andrade *et al.* (2009). Por lo tanto, sería interesante volver a evaluar los mismos genotipos hasta final de ciclo bajo condiciones de campo y tener en cuenta las variables evaluadas en el presente trabajo de tesis.

Las mismas siete líneas evaluadas previamente en el ensayo de invernáculo, fueron caracterizadas mediante marcadores microsatélites (SSR). En total se analizaron 127 marcadores SSR de los cuales, 94 lograron discriminar de dos a seis alelos, permitiendo detectar entre 46 y 64% de marcadores polimórficos entre las líneas parentales. Por otro lado, en cuanto a las medidas de diversidad genética por *locus*, tanto los índices D (0,52) como He (0,56) mostraron una variabilidad intermedia para el conjunto de marcadores analizados. Por su parte, los valores observados para Na y Ne resultaron bajos (2,8 y 2,3, respectivamente), debido principalmente a que el 47% de los marcadores amplificaron solo dos alelos. Esta diversidad genética baja se relacionaría directamente con la reducción de la base genética que sufren las líneas durante los distintos ciclos de selección, disminuyendo así la variabilidad de los materiales utilizados en el mejoramiento de la especie (Moreno, 2010). A su vez, Cervigni *et al.* (2010) sostiene que, la falta de polimorfismos es común en poblaciones derivadas de cruzamientos entre progenitores de base genética estrecha. Además, el girasol sufre una marcada depresión por endogamia al inducirse la autofecundación para la generación de las líneas. Acorde con esto, Moreno (2010) encontró que las estimas de diversidad calculadas para las líneas endogámicas fueron menores en comparación con los compuestos y las poblaciones de polinización abierta de la especie.

Otra forma de cuantificar el polimorfismo presente en un *locus* determinado es a través del contenido de información polimórfica (PIC). Un valor PIC menor a 0,25 indica bajo polimorfismo, uno entre 0,25 y 0,50 muestra un polimorfismo intermedio y un valor mayor a 0,50 indica que el *locus* es altamente polimórfico (Liu *et al.*, 2007). Cuando el número de alelos es grande el PIC se aproxima a He, mientras que cuando las frecuencias alélicas se parecen entre sí, el PIC es menor que He. Este es el caso del PIC promedio detectado para los 91 SSR analizados en el presente trabajo (PIC=0,46). En este sentido, los valores de PIC y He (0,56) detectados aquí, serían consistentes con los informados por Filippi *et al.* (2015), quienes reportaron un valor PIC=0,50 y He=0,51 para 42 SSR analizados en 170 entradas de un panel de asociación. No obstante, el menor valor de PIC detectado en el presente trabajo posiblemente tenga relación con el alto número de marcadores que solo detectaron dos alelos, reduciendo así la variabilidad total del conjunto de marcadores analizados. En cambio, a diferencia de Filippi *et al.* (2015), la He que se detectó con este grupo de marcadores fue mayor posiblemente, por el alto número de marcadores SSR seleccionados para este análisis; permitiendo detectar un gran número de alelos totales.

En cuanto a la riqueza alélica y los índices de diversidad por tipo de marcador se evidenció una reducción de las medidas de diversidad estimadas para los EST-SSR, posiblemente relacionado con la naturaleza de este tipo de marcadores. Los SSR genómicos (gSSR) capturan una mayor diversidad que los EST-SSR, debido a que estos últimos provienen de regiones codificantes más conservadas que los gSSR. En este sentido, Filippi *et al.* (2015) reportó datos similares para 22 gSSR y 20 EST-SSR analizados. Así mismo, Moreno *et al.* (2013) detectaron un valor PIC=0,50 y He=0,56 para 16 gSSR en 14 entradas del Banco Activo de Germoplasma de Girasol de INTA- EEA Manfredi (BAG-IM). Cabe destacar además que se pudo identificar un panel de 21 marcadores SSR altamente polimórficos (PIC $\geq$ 0,57) que permitieron detectar de cuatro a seis alelos. Así mismo, Paniego *et al.* (2002) obtuvieron resultados similares logrando identificar 20 gSSR altamente informativos y capaces de discriminar entre 16 líneas endocriadas de girasol cultivado. Por lo que, dicho número de marcadores sería suficiente para la identificación inequívoca de genotipos únicos.

A partir de los datos moleculares y con el fin de determinar la relación genética entre las siete líneas estudiadas se realizó un análisis de conglomerados. Así que, el dendrograma se obtuvo a partir las distancias calculadas con el índice de Nei *Standard* y mediante el algoritmo de encadenamiento promedio (UPGMA); con un coeficiente de correlación cofenética igual a 0,71. Esto último indica que el gráfico estaría reflejando los valores de la matriz de distancia. A una

distancia igual a 1,05 se diferenciaron dos grupos bien definidos, uno formado por HAR4 y B59 (mantenedoras de androesterilidad y de origen argentino) y el otro, por los demás genotipos separados a su vez en dos subgrupos a una distancia de 0,95. Uno de estos subgrupos contiene a R423, HA89 y R419, lo cual es esperable ya que R419 deriva de HA89. El agrupamiento de estas líneas con R423 probablemente se debió a que esta última es una restauradora de la fertilidad y de origen argentino, igual que R419. Por otro lado, el segundo subgrupo constituido por R432 y HA64 podría deberse a que comparten un 45% de similaridad entre los marcadores SSR analizados. Ambas líneas poseen en su *pedigree* materiales provenientes de Rusia, dado que HA64 fue generada en EEUU a partir de una selección rusa y R432 es una línea generada en Argentina a partir del cruzamiento entre un silvestre y una línea norteamericana derivada de material ruso (Álvarez D., comunicación personal). Con base en lo descrito se observó en el análisis de conglomerados que ambas líneas se ubicaron próximas entre sí (distancia = 0,76). Los grupos así obtenidos son coincidentes con lo encontrado por Filippi *et al.* (2015) en su análisis de conglomerados para las 170 entradas del panel de asociación con 42 SSR. En este caso, los autores reportaron estos dos mismos grandes grupos; excepto que en dicho trabajo R432 se agrupó con B59 y HAR4, posiblemente debido a que comparten el mismo origen geográfico.

En estudios previos realizados por el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología (INTA-EEA Manfredi), se detectó un gran número de marcadores con segregación distorsionada en una población segregante  $F_2$  de girasol. Es por ello, que cinco poblaciones obtenidas previamente por el grupo de Mejoramiento de Girasol de INTA-EEA Manfredi (B59xR432, B59xR423, R419xR432, R423xR419 y R419xR423), y se encontraban disponibles al iniciar la presente tesis, fueron sometidas al análisis de segregación. Estas últimas dos poblaciones también se analizaron con el fin de determinar la posible presencia de algún efecto materno en dicha distorsión. Así que, con base en la caracterización molecular de las líneas, se seleccionó un subgrupo de marcadores que presentaron una correcta amplificación dentro de la PCR *multiplex* y una buena resolución en el gel de poliacrilamida. Estos permitieron caracterizar las cinco poblaciones  $F_2$  segregantes obtenidas a partir del cruzamiento inicial de cuatro de las siete líneas previamente evaluadas. En total se seleccionaron 34 marcadores para cada cruzamiento y estos fueron evaluados en 70 individuos  $F_2$  de cada población. Con los datos obtenidos de la genotipificación se realizó una prueba  $\chi^2$  a fin de determinar si los marcadores presentaban distorsión en su segregación. Este fenómeno se define como el desvío de las frecuencias alélicas observadas en un *locus* con respecto a la proporción mendeliana esperada en una población

segregante y se detecta comúnmente por mapeo genético (Song *et al.*, 2006). Estos desvíos en la segregación mendeliana han sido documentados y estudiados en diferentes cultivos tales como algodón (Li *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2017), arroz (Xu *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012), girasol (Rieseberg *et al.*, 1993; Berry *et al.*, 1995; Quillet *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2013), maíz (Yan *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012, Tang *et al.*, 2013), soja (Baumbach *et al.*, 2012) y trigo (Li *et al.*, 2015) entre otros.

El análisis de segregación de marcadores evidenció distorsión de la segregación en las cinco poblaciones  $F_2$  evaluadas; siendo R423xR419 la que presentó la mayor distorsión para los 34 *loci* analizados con un desvío hacia el parental femenino (R423) en el 100% de los individuos analizados. En cuanto a las demás poblaciones se observó un porcentaje variable de marcadores distorsionados (B59xR432: 9%, B59xR423: 21%, R419xR423: 15% y R419xR432: 15%), con desvíos hacia alguno de los parentales o hacia el heterocigota. De modo que, el nivel de distorsión detectado para B59xR432 fue mucho menor que el encontrado previamente por el grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología (40% en 42 SSR analizados). Esto probablemente se debió al bajo número de individuos analizados (seis por cada *bulk* segregante) en dicho trabajo (Michelmore *et al.*, 1991; Collard *et al.*, 2005). Por otro lado, cuando a R419 se lo cruza con R423, el porcentaje de marcadores distorsionados se reduce a 15%. Sin embargo, cuando R423 es utilizado como parental femenino, dicha distorsión aumenta significativamente, con el 100% de los marcadores distorsionados. Este resultado tiene relación con los reportados por Tang *et al.* (2013) quienes encontraron un patrón diferencial de segregación de marcadores (asociados a *loci* de distorsión de segregación o LDS en maíz) en dos poblaciones  $F_2$  recíprocas. Por esto, concluyen que existiría una asociación entre la distorsión de la segregación y el ambiente citoplasmático materno; sugiriendo que la incompatibilidad citonuclear podría explicar parcialmente la selección de la viabilidad de gametas y cigotos en ambientes citoplasmáticos diferentes. Así mismo, trabajos previos arribaron a las mismas conclusiones (Goloenko *et al.*, 2002; Mangum y Peffley, 2005). Dichos LDS se consideran como elementos genéticos que manipulan la transmisión mendeliana para su propio beneficio (Tang *et al.*, 2013). Por consiguiente, no distorsionarían la meiosis *per se*, sino que alterarían los productos de esta, rompiendo cromosomas homólogos o abortando gametas que no los porten. Así mismo, las gametas masculinas son las que se ven afectadas con mayor frecuencia, por ejemplo, por la presencia de un sistema de “polen asesino” como se ha detectado en arroz (Yang *et al.*, 2012). Estos *loci* de distorsión se han asociado a *loci* gametofíticos y genes de esterilidad (Kinoshita,

1993; Cheng *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2017), los cuales podrían ser los determinantes de la selección gamética y cigótica y, en consecuencia, causantes de la distorsión de segregación. En el caso del girasol, estos *loci* podrían estar relacionados con la viabilidad del polen (Quillet *et al.*, 1995) o a genes restauradores de la androesterilidad (Liu *et al.*, 2013). En este sentido, dichos *loci* podrían estar causando el desvío extremo hacia uno de los parentales en el cruzamiento R423 x R419, causando que el 100% de los individuos analizados presenten solo el alelo del parental R423 en el 100% de los marcadores genotipados.

Si bien la mayoría de los marcadores distorsionados se distribuyen al azar en los mapas de referencia de girasol utilizados (Tang *et al.*, 2002; Talia *et al.*, 2010; Zubrzycki, 2014), los marcadores moleculares HA2579 y ORS613 (GL 10) mapean en una región de marcadores distorsionados presentes en el mapa de Tang *et al.* (2002). En este caso, el desvío que presentaron ambos marcadores fue hacia el alelo presente en el parental R419, en el 100% de los individuos analizados de la población R419xR432. En este sentido, solamente Tang *et al.* (2002) encontraron un 12,6% de marcadores distorsionados con un defecto de heterocigotas. Algo parecido se observó en B59xR432 que mostró un déficit de heterocigotas en dos de los tres marcadores distorsionados. En este caso, la selección estaría operando en contra de uno de los dos genomas parentales como observó Tang *et al.* (2002), en seis regiones genómicas en donde los marcadores distorsionados tendieron a agruparse. De ahí que los autores suponen la existencia de *loci* de distorsión de segregación (LDS), los cuales provocarían dicho patrón de distorsión. Así mismo, las poblaciones R419xR423 y R419xR432 también evidenciaron un déficit de heterocigotas en tres y en cuatro de los cinco marcadores distorsionados, respectivamente. Por el contrario, B59xR423 evidenció distorsión hacia alguno de los parentales o hacia el heterocigota, dependiendo del marcador. Estos resultados son consistentes con otros autores que han encontrado distorsión de segregación con desvíos hacia alguno de los parentales (Rieseberg *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007) así como también un déficit de heterocigotas (Quillet *et al.*, 1995) o un exceso de estos (Zhao *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2017).

A pesar de que la distorsión de segregación está bien documentada en diversos cultivos, en girasol los únicos trabajos que hacen referencia a este fenómeno son Quillet *et al.* (1995) y Liu *et al.* (2013). En ambos trabajos reportaron que dicha distorsión se relaciona con *loci* asociados a la viabilidad del polen (Quillet *et al.*, 1995) y a un gen restaurador de la androesterilidad (*Rf6*) (Liu *et al.*, 2013). Los marcadores mapeados por los autores tendieron a agruparse con estos

*loci*; motivo por el cual Liu *et al.* (2013) asumen que existiría supresión de la recombinación o selección gamética en dicha región; además de genes *S* interespecíficos y translocación cromosómica. Por lo tanto, a fin de determinar si la distorsión de la segregación observada en el conjunto de marcadores analizados se debía a una selección gamética o cigótica, se realizó la prueba  $\chi^2$  para las frecuencias alélicas y genotípicas en las cinco poblaciones evaluadas en la presente tesis. Es así que, de los 17 marcadores distorsionados, el 29% presentó distorsión de la segregación alélica solamente, el 18% distorsión de las frecuencias genotípicas y el 41% restante presentó distorsión de ambos tipos de frecuencias. Por lo tanto, en los dos primeros casos estaría actuando la selección gamética y cigótica por separado, mientras que, en el último, ambos tipos de selección actuarían simultáneamente. No obstante, un solo marcador molecular (ORS1041) no presentó ningún tipo de distorsión en sus frecuencias tanto alélica como genotípica.

Estos resultados son consistentes con los encontrados por Zhao *et al.* (2006) en arroz y Li *et al.* (2007) en algodón. Dichos autores analizaron la distorsión de la segregación de marcadores SSR en poblaciones  $F_2$  y en ambos estudios concluyen que la razón de la distorsión se relacionaría con genes gametofíticos y de esterilidad cercanos a los marcadores distorsionados. Estos, tendieron a agruparse en regiones especiales dentro del cromosoma llamadas Regiones de Distorsión de Segregación (RDS) (Xu *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015), dentro de las cuales se encontrarían los *loci* de distorsión de segregación (LDS) previamente citados (Song *et al.*, 2006). Si estos *loci* segregan en una población, el marcador que esté ligado a ellos, mostrará distorsión y cuanto mayor sea ese ligamiento entre ambos, mayor será el valor  $\chi^2$  que presente. Por lo tanto, se podría determinar la localización de un LDS mediante la relación entre el valor  $\chi^2$  y la localización del marcador (Cheng *et al.*, 1996). Este podría ser el caso de alguno de los marcadores analizados en este trabajo de tesis, los cuales han presentado un valor alto de  $\chi^2$ , no obstante, debido al bajo número de marcadores analizados por cada grupo de ligamiento no se pudo establecer dicha relación. Este tipo de LDS han sido identificados y mapeados en diferentes cultivos como algodón (Dai *et al.*, 2017), arroz (Wang *et al.*, 2005), maíz (Tang *et al.*, 2013) y trigo (Kumar *et al.*, 2007) entre otros. Estos *loci* han sido asociados a *loci* gametofíticos y genes de esterilidad (Kinoshita, 1993; Cheng *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2017), los cuales podrían ser los determinantes de la selección gamética y cigótica y en consecuencia, causantes de la distorsión de segregación. En el caso del girasol, estos *loci* podrían estar relacionados con genes

restauradores de la androesterilidad (Liu *et al.*, 2013). En este sentido, el marcador ORS613 fue mapeado cerca del gen *ms9* que causa androesterilidad en girasol (Chen *et al.*, 2006).

Con base en el análisis fenotípico y molecular de las líneas parentales, así como también en el análisis genotípico de las cinco poblaciones segregantes, se procedió a determinar cuál de ellas sería la más adecuada para llevar adelante el desarrollo de un mapa de ligamiento para la posterior identificación y localización de regiones genómicas asociadas al estrés hídrico. Por lo tanto, de acuerdo con la evaluación fenotípica se infiere que la población elegida para realizar un mapa de ligamiento debería proceder del cruzamiento de los genotipos de baja eficiencia transpiratoria (ET) (R419 y HA89) con aquellos pertenecientes al grupo de alta ET (HA64 y HAR4). No obstante, no pudieron ser evaluadas ya que no estaban disponibles al momento de iniciar el presente trabajo de tesis. Por otro lado, a partir del dendrograma se infiere que la población  $F_2$  elegida para realizar un mapa genético debería proceder del cruzamiento entre B59 o HAR4 con algún genotipo del otro grupo (R419, HA89, R423, R432 y HA64). Así mismo, debería provenir del cruzamiento de líneas parentales con un alto nivel de polimorfismo entre ellas, de manera tal de maximizar esa distancia. Sin embargo, debido a que B59 presentó una eficiencia transpiratoria intermedia en la evaluación en invernáculo y en el campo se comportó como susceptible al estrés hídrico, las poblaciones  $F_2$  que provienen del cruzamiento de esta línea con otro parental, por el momento no deberían ser consideradas como posibles poblaciones de mapeo. Por lo tanto, sería prudente tener en cuenta alguna población proveniente del cruzamiento entre HAR4 y algún genotipo del otro grupo. De lo contrario, también se podría recurrir al cruzamiento proveniente de una de las líneas de los subgrupos formados dentro del segundo grupo (subgrupo 1: R423, HA89 y R419; subgrupo 2: R432 y HA64); siempre considerando su comportamiento contrastante frente al estrés hídrico.

Si bien se dijo que la elección de la mejor población  $F_2$  para realizar un mapa de ligamiento genético era aquella que presentara además un menor número de marcadores distorsionados, no sería oportuno considerar a B59xR432 y a B59xR423 por las razones expuestas previamente; además porque esta última presentó 21% de distorsión de la segregación. En cuanto a R423xR419 se la descartó como posible población de mapeo debido al alto porcentaje de distorsión que presentó. Mientras que las poblaciones, R419xR423 y R419xR432 han tenido el mismo porcentaje de marcadores distorsionados (15%). Sin embargo, debido a que R419 y R423 se ubicaron en el mismo subgrupo en el dendrograma, no serían parentales propicios debido a la estrecha relación genética que presentaron. No obstante, la segunda población (R419xR432)



mostró mayor número de marcadores polimórficos entre las líneas (64%) y los parentales se ubicaron en subgrupos distintos del dendrograma, con una distancia entre ellos igual a 1,29. Por lo tanto, dicha población sería la más adecuada para continuar las evaluaciones a fin de identificar las regiones genómicas involucradas en la tolerancia al estrés hídrico.

Así mismo, de estos resultados se desprende que entender la respuesta genética y fenotípica al estrés hídrico es esencial para una comprensión holística del mecanismo de tolerancia. Es por ello, que indagar en la asociación entre las variables evaluadas en el presente trabajo permitirá crear bases ecofisiológicas para la selección de parentales contrastantes y para la identificación de QTLs asociados a dicho carácter. En este sentido, la variabilidad genotípica identificada a partir de este estudio ofrece líneas parentales candidatas para una estrategia de mejoramiento buscando optimizar el rendimiento en girasol bajo condiciones de déficit hídrico y la generación de poblaciones segregantes para el estudio del carácter.

## 10. CONCLUSIONES

Mediante este estudio fue posible seleccionar una población  $F_2$  de mapeo adecuada para construir un mapa genético en girasol por medio de la caracterización molecular y fenotípica de las líneas parentales y el análisis de segregación de marcadores en sus poblaciones  $F_2$ . A su vez, fue posible identificar genotipos contrastantes para la eficiencia transpiratoria por medio de la evaluación fenotípica en invernáculo durante el periodo vegetativo. Por otro lado, no se pudo determinar a qué línea parental del cruzamiento B59xR432 se debió la distorsión de segregación previamente detectada, probablemente debido al bajo número de individuos utilizados en los *bulk* segregantes.

## 11. PERSPECTIVAS

Si bien R432 mostró eficiencia transpiratoria intermedia en invernáculo, resultó tolerante en el ensayo de campo realizado por el Grupo de Mejoramiento de Girasol (Andrade *et al.*, 2009). Por lo tanto, antes de considerar a R419xR432 como una posible población de mapeo, sería oportuno realizar un nuevo ensayo para evaluar estas mismas líneas bajo condiciones de campo y teniendo en cuenta las mismas variables evaluadas en el ensayo de invernáculo realizado en la presente tesis.

Por otro lado, se cuenta con dos poblaciones  $F_2$  segregantes nuevas (HA89xHAR4 y R419xHA64), generadas recientemente por el Grupo de Mejoramiento de Girasol (INTA-EEA Manfredi). De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis, las líneas parentales presentan 60% de polimorfismo entre ellas y eficiencia transpiratoria contrastantes. Por ello, se prevé analizar estas poblaciones segregantes con marcadores moleculares al finalizar la presente tesis de maestría, a fin de determinar la segregación de los marcadores.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Abbate, P. E., Dardanelli, J. L., Cantarero, M. G., Maturano, M., Melchiori, R. J. M. and Suero, E. E. (2004). Climatic and water availability effects on water-use efficiency in wheat. *Crop Science*, 44, 474–483.
- Abdi, N., Darvishzadeh, R., Jafari, M., Pirzad, A. and Haddadi, P. (2012). Genetic analysis and QTL mapping of agro-morphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under two contrasting water treatment conditions. *Plant OMICS Journal*, 5(2), 149–158.
- Adiredjo, A. L., Navaud, O., Lamaze, T. and Grieu, P. (2014a). Leaf carbon isotope discrimination as an accurate indicator of water-use efficiency in sunflower genotypes subjected to five stable soil water contents. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(6), 416–424.
- Adiredjo, A. L., Navaud, O., Muños, S., Langlade, N. B., Lamaze, T. and Grieu, P. (2014b). Genetic control of water use efficiency and leaf carbon isotope discrimination in sunflower (*Helianthus annuus* L.) subjected to two drought scenarios. *PLoS ONE*, 9(7), 15 p.
- Aguirrezábal, L. A. N., Orioli, G. A., Hernández, L. F., Pereyra, V. R. y Miravé, J. P. (2001). *Girasol: Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento*. Balcarce, Buenos Aires (AR): INTA – EEA. Unidad Integrada. 111 p.
- Aguirrezábal, L. A. N. y Andrade, F. H. (2002). Ecofisiología. En: Díaz-Zorita, M. y Duarte, G. A. (Eds.). *Manual práctico para el cultivo de girasol*. Buenos Aires (AR): Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR). Hemisferio Sur S. A. (pp. 27 – 49).
- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D. and Smith, M. (1998). *Reference evapotranspiration (ET<sub>0</sub>)*. In: Crop evapotranspiration: Guidelines for computing crop water requirements. FAO, Irrigation and Drainage. Rome (Italy). Paper 56, 15–86.
- Andrade, A., Vigliocco, A. and Alemano, S. (2009). Differential accumulation of abscisic acid and its catabolites in drought-sensitive and drought-tolerant sunflower seeds. *Seed Science Research*, 19, 201–211.
- Andrade A., Vigliocco A., Escalante M. y Alemano S. (2014). *Efecto del estrés hídrico e inhibidor de la síntesis de ácido jasmónico en plántulas de girasol (Helianthus annuus L.)*. En: XV Congreso Latinoamericano. XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 21 al 24 de septiembre de 2014. Mar del Plata, Buenos Aires (AR).
- Andriani, J.M. (s.f.). *Dinámica del agua en cultivos extensivos*. Oliveros, Santa Fe (AR): INTA-EEA. 14 p.

- Anjum, S., Xie, X. and Wang, L. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026–2032.
- Anónimo (s.f.). *Unidad N° 3: Relaciones metabólicas y economía del carbono*. Fisiología Vegetal. Córdoba (AR): FCA, Universidad Nacional.
- ASAGIR. Asociación Argentina de Girasol. *El Girasol*. Disponible en <http://www.asagir.org.ar>. Consultado el 18-06-17.
- Badouin, H., Gouzy, J., Grassa, C. J., Murat, F., Staton, S. E., Cottret, L. *et al.*, (2017). The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*, 546, 148–152.
- Balzarini M. G. y Di Rienzo J. A. (2011) *InfoGen versión 2011*. Córdoba (AR): FCA, Universidad Nacional. Disponible en <http://www.info-gen.com.ar>
- Baumbach, J., Rogers, J. P., Slattey, R. A., Narayanan, N. N., Xu, M., Palmer, R. G. *et al.*, (2012). Segregation distortion in a region containing a male-sterility, female-sterility locus in soybean. *Plant Science*, 195, 151–156.
- Berry, S. T., Leon, A. J., Hanfrey, C. C., Challis, P., Burkholz, A., Barnes, S. R. *et al.*, (1995). Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor Appl Genet*, 91, 195–199.
- Bigo V. (2005). *Caracterización de germoplasma de girasol (Helianthus annuus L.)*, en condiciones de estrés hídrico. (Tesis inédita de Licenciatura). Río Cuarto, Córdoba (AR): Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. 19 p.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M. and Davis R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314 – 331.
- Boyer, J. S. (1970). Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology*, 46(2), 233–235.
- Casadebaig, P., Debaeke, P. and Lecoer, J. (2008). Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. *European Journal of Agronomy*, 28(4), 646–654.
- Cervigni, G. D. L., Ortiz, J. P. A. y Feingold, S. E. (2010). Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas. En: Levitus, G. *et al.* (Eds). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Buenos Aires (AR): Ediciones INTA. Cap. 6 (pp. 86 – 99).

- Chen, J., Hu, J., Vick, B. A. and Jan, C. C. (2006). Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers. *Theor Appl Genet*, 113(1), 122–127.
- Cheng, R., Saito, A., Takano, Y. and Ukai, Y. (1996). Estimation of the position and effect of a lethal factor locus on a molecular marker linkage map. *Theor Appl Genet*, 93(4), 494–502.
- Chimenti, C. A. and Hall, A. J. (1994). Responses to water stress of apoplastic fraction and bulk modulus of elasticity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes of contrasting capacity for osmotic adjustment. *Plant and Soil*, 166, 101–107.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B. and Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142(1–2), 169–196.
- Condon, A. G., Richards, R. A., Rebetzke, G. J., Farquar, G.D. (2004). Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 55:2447-2460.
- Connor, D. J. and Jones, T. R. (1985). Response of sunflower to strategies of irrigation II. morphological and physiological responses to water stress. *Field Crops Research*, 12, 91–103.
- Creste, S., Tulmann Neto, A. and Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4), 299–306.
- Dai, B., Guo, H., Huang, C., Ahmed, M. M. and Lin, Z. (2017). Identification and Characterization of Segregation Distortion Loci on Cotton Chromosome 18. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–11.
- Dardanelli, J., Collino, D., Otegui, M. E. y Sadras, V. O. (2003). Bases funcionales para el manejo del agua en los sistemas de producción de los cultivos de grano. En: Pascale, A. J. (Ed.). *Producción de granos: Bases funcionales para su manejo*. Buenos Aires (AR): Universidad Nacional. Facultad de Agronomía. Cap. 16 (pp. 375 – 440).
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. *InfoStat versión 2011*. Grupo InfoStat. Córdoba (AR): FCA, Universidad Nacional. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
- Druetta, A. L. (2016). *Caracterización fenotípica de la respuesta al estrés hídrico en líneas endocriadas de girasol (Helianthus annuus L.)*. (Tesis inédita de Ingeniería). Villa María, Córdoba (AR): Universidad Nacional. Instituto A.P. Ciencias Básicas y Aplicadas. 54 p.

- Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Kiani, S. P., Nabipour, A., Shariati, F., *et al.* (2008). QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome*, 51(8), 599–615.
- Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Calmon, A., Grieu, P. and Sarrafi, A. (2009). QTL mapping of protein content and seed characteristics under water-stress conditions in sunflower. *Genome*, 52(5), 419–30.
- Escalante, M., Andrade, A., Vigliocco, A. y Alemano, S. (2014). *Evaluación geno-fenotípica de líneas endocriadas de girasol (B71 y B59) contrastantes en la respuesta a estrés hídrico y de sus poblaciones segregantes*. En: 6º Congreso Argentino de Girasol. 27 de mayo de 2014. Buenos Aires (AR).
- FAS USDA (2017). Foreign Agricultural Service. United States Department of Agriculture. Market and Trade Data. PSD Online. Disponible en <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/compositeViz>. Consultado el 15-07-17.
- Fernández C., Gallo R., Alemano S., Gieco J., Alvarez D. y Abdala G. (2010). *Caracterización fenotípica de familias F<sub>3</sub> de girasol (A59 x R432) con diferente tolerancia a sequía*. En: XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 26 al 29 de setiembre de 2010. La Plata, Buenos Aires (AR).
- Fernández, C. S. (2016). *Evaluación de la Respuesta a Estrés Hídrico en una Población Segregante de Girasol Cultivado*. (Tesis inédita de Doctorado). Río Cuarto, Córdoba (AR): Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. 163 p.
- Fernández D. A. (2014). *Análisis de segregación de marcadores microsatélites en una población de mapeo F<sub>2</sub> para el carácter alto oleico en girasol cultivado (Helianthus annuus var. macrocarpus)*. (Tesis inédita de Licenciatura). Posadas, Misiones (AR): Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. 56 p.
- Filippi, C. V., Aguirre, N., Rivas, J. G., Zubrzycki, J., Puebla, A., Cordes, D., *et al.* (2015). Population structure and genetic diversity characterization of a sunflower association mapping population using SSR and SNP markers. *BMC Plant Biology*, 15(1), 52.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., and Valè, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3), 317–342.

- Fusari, C. M., Lia, V. V, Hopp, H. E., Heinz, R. A. and Paniego, N. B. (2008). Identification of Single Nucleotide Polymorphisms and analysis of Linkage Disequilibrium in sunflower elite inbred lines using the candidate gene approach. *BMC Plant Biology*, 8:7. 14 p.
- Fusari, C. M., Di Rienzo, J. A., Troglia, C., Nishinakamasu, V., Moreno, M. V, Maringolo, C., *et al.* (2012). Association mapping in sunflower for Sclerotinia Head Rot resistance. *BMC Plant Biology*, 12:93. 13 p.
- Gedil, M. A., Wye, C., Berry, S., Segers, B., Peleman, J., Jones, R., *et al.* (2001). An integrated restriction fragment length polymorphism--amplified fragment length polymorphism linkage map for cultivated sunflower. *Genome*, 44, 213–221.
- Gentzbittel, L., Vear, F., Zhang, Y. X., Bervillé, A. and Nicolas, P. (1995). Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet*, 90, 1079–1086.
- Gholipoor, M., Prasad, P. V. V., Mutava, R. N. and Sinclair, T. R. (2010). Genetic variability of transpiration response to vapor pressure deficit among sorghum genotypes. *Field Crops Research*, 119(1), 85–90.
- Gil, R. (2002). *El comportamiento físico-funcional de los suelos*. Disponible en <http://www.agroestrategias.com/pdf/Suelos - El Comportamiento Fisico del Suelo.pdf>.
- Golberg, A. D. (2008). Las plantas frente a la limitación hídrica. En: Golberg, A. D. y Kin, A. G. (Eds.). *El agua: de la molécula a la biósfera*. Santa Rosa, La Pampa (AR): Ediciones INTA. Cap. 5 (pp. 97 – 130).
- Goloenko, I. M., Davydenko, O. G. and Shimkevich, A. M. (2002). Segregation Distortion of Marker Nuclear Genes in Alloplasmic and Isoplasmic Lines of Barley. *Russian Journal of Genetics*, 38(7), 791–795.
- González, J. (2016). Mejoramiento genético de girasol (*Helianthus annuus*) en INTA - EEA Pergamino, a partir de distintas fuentes de germoplasma. *Revista de Tecnología Agropecuaria*, 10 (31), 49–52.
- González, J., Mancuso, N., Álvarez, D., Cordes, D. and Vázquez, A. (2015). Contribution of the Argentine germplasm to the improvement of sunflower. *Helia*, 20 p.
- Hervé, D., Fabre, F., Berrios, E. F., Leroux, N., Al Chaarani, G., Planchon, C., *et al.* (2001). QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany*, 52(362), 1857–1864.
- Holleley, C. E. and Geerts, P. G. (2009). Multiplex Manager 1.0: A cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques*, 46(7), 511–517.

- Hsiao, T. C. (1973). Plant responses to water stress. *Ann Rev. Plant Physiol*, 24, 519–570.
- Hu, J. and Vick, B. A. (2003). Target region amplification polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(3), 289–294.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R. and Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309–334.
- Kinoshita, T. (1993). Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage group. *Rice Genet Newsl*, 10, 7– 39.
- Kolkman, J. M., Berry, S. T., Leon, A. J., Slabaugh, M. B., Tang, S., Gao, W., *et al.* (2007). Single nucleotide polymorphisms and linkage disequilibrium in sunflower. *Genetics*, 177(1), 457–468.
- Kugler, W. F. y Godoy, E. F. (1964). Oleaginosas. 1. Girasol. En: Parodi, L. R. (Ed.). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Buenos Aires (AR): ACME S.A.C.I. Vol. 2, pt. 1. Cap. 17 (pp. 621 – 638).
- Kumar, S., Gill, B. S. and Faris, J. D. (2007). Identification and characterization of segregation distortion loci along chromosome 5B in tetraploid wheat. *Mol Genet Genomics*, 278(2), 187–196.
- Leclercq, P. (1966). Une stérilité mâle utilisable pour la production d'hybrides simples de tournesol. *Ann Amelior Plant*, 16(2), 135-144.
- Lai, Z., Livingstone, K., Zou, Y., Church, S. A., Knapp, S. J., Andrews, J. and Rieseberg, L. H. (2005). Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower. *Theor Appl Genet*, 111(8), 1532–1544.
- Li, C., Bai, G., Chao, S. and Wang, Z. (2015). A high-density SNP and SSR consensus map reveals segregation distortion regions in wheat. *BioMed Research International*, 11 p.
- Li, H., Kilian, A., Zhou, M., Wenzl, P., Huttner, E., Mendham, N., *et al.* (2010). Construction of a high-density composite map and comparative mapping of segregation distortion regions in barley. *Mol Genet Genomics*, 284(5), 319–331.
- Li, W., Lin, Z. and Zhang, X. (2007). A Novel Segregation Distortion in Intraspecific Population of Asian Cotton (*Gossypium arboreum* L.) Detected by Molecular Markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(7), 634–640.
- Liu, X., Guo, L., You, J., Liu, X., He, Y., Yuan, J., *et al.* (2010). Progress of Segregation Distortion in Genetic Mapping of Plants. *Research Journal of Agronom*, 4(4), 78-83.



- Liu, Z., Wang, D., Feng, J., Seiler, G. J., Cai, X. and Jan, C. C. (2013). Diversifying sunflower germplasm by integration and mapping of a novel male fertility restoration gene. *Genetics*, 193(3), 727–737.
- Liu, Z-P., Liu, G-S. and Yang, Q-C. (2007). A novel statistical method for assessing SSR variation in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 385 – 391.
- Lorieux, M. (2012). MapDisto: Fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Molecular Breeding*, 30(2), 1231–1235.
- Lovera, E. F, Gil, R. C. y Martellotto, E. E. (1993). *Características edáficas y climáticas del área perteneciente al P. A. C. II Zona Centro*. Información técnica. Áreas de Desarrollo Rural y Recursos Naturales. Manfredi, Córdoba (AR): INTA - EEA. (pp. 6 – 14).
- Lovera, E. F. y Basanta, M. del V. (2007). *Informe de análisis de suelo*. Laboratorio de análisis de suelo y agua. Manfredi, Córdoba (AR): INTA – EEA. 1 p.
- Lu, H., Romero-Severson, J. and Bernardo, R. (2002). Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. *Theor Appl Genet*, 105(4), 622–628.
- MA, (2016). Ministerio de Agroindustria. Perfil del mercado mundial del aceite de girasol. Disponible en <http://www.agroindustria.gob.ar/new/0-0/programas/dma/newsletters/nro83/nl-acgir.php>. Consultado el 02-07-17.
- MA, (2017). Ministerio de Agroindustria. Datos Agroindustriales. Producción Agroindustrial. Estimaciones agrícolas. Disponible en <https://datos.agroindustria.gob.ar/dataset/estimaciones-agricolas>. Consultado el 13-03-18.
- Mandel, J. R., Dechaine, J. M., Marek, L. F. and Burke, J. M. (2011). Genetic diversity and population structure in cultivated sunflower and a comparison to its wild progenitor, *Helianthus annuus* L. *Theor Appl Genet*, 123(5), 693–704.
- Mandel, J. R., Nambeesan, S., Bowers, J. E., Marek, L. F., Ebert, D., Rieseberg, L. H., *et al.* (2013). Association Mapping and the Genomic Consequences of Selection in Sunflower. *PLoS Genetics*, 9(3), 1–13.
- Mangin, B., Pouilly, N., Boniface, M. C., Langlade, N. B., Vincourt, P., Vear, F., *et al.* (2017). Molecular diversity of sunflower populations maintained as genetic resources is affected by multiplication processes and breeding for major traits. *Theor Appl Genet*, 130(6), 1099–1112.
- Mangum, P. D. and Peffley, E. B. (2005). Central cell nuclear-cytoplasmic incongruity: A mechanism for segregation distortion in advanced backcross and selfed generations of

- (*Allium cepa* L. x *Allium fistulosum* L.) x *A. cepa* interspecific hybrid derivatives. *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1–3), 400–407.
- Marc, J. and Palmer, J. H. (1981). Photoperiodic sensitivity of inflorescence initiation and development in sunflower. *Field Crops Research*, 4(1981), 155–164.
- Maringolo C. A. (2007). *Regiones cromosómicas asociadas a resistencia a Podredumbre Húmeda del Capítulo de girasol (Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary)*. (Tesis inédita de Maestría). Mar del Plata, Buenos Aires (AR): Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Agrarias. 133 p.
- Martínez, M. C., Helguera, M. y Carrera, A. (2010). Marcadores Moleculares. En: Levitus, G. et al. (Eds). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Buenos Aires (AR): Ediciones INTA. Cap. 5 (pp. 70 – 85).
- Melgarejo, M. (2003). *Girasol-Usos*. Cuadernillo Informativo N°3. Asociación Argentina de Girasol. (ASAGIR). Disponible en <file:///C:/Users/Anonymous/Downloads/200884143429.pdf> Consultado el 10-06-17.
- Michelmore, R. W., Paran, I. and Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Genetics*, 88, 9828–9832.
- Mokrani, L., Gentzbittel, L., Azanza, F., Fitamant, L., Al-Chaarani, G. and Sarrafi, A. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet*, 106, 149–156.
- Morales-Morales, E. J., Morales-Rosales, E. J., Díaz-López, E., Cruz-Luna, A. J., Medina-Arias, N. y Guerrero-De La Cruz, M. (2015). Tasa de asimilación neta y rendimiento de girasol en función de urea y urea de liberación lenta. *Agrociencia*, 49(2), 163–176.
- Moreno, M.V. (2010). *Diversidad genética en girasol cultivado: análisis de una colección de germoplasma local para su aplicación en programas de mejoramiento*. (Tesis inédita de Doctorado). Buenos Aires (AR): Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 237 p.
- Moreno, M. V., Fusari, C. M., Gieco, J., Rienzo, J. Di, Hopp, E., Heinz, R. and Paniego, N. (2012). *Association mapping of drought tolerance in sunflower: phenotypic and genetic characterization of INTA inbred lines*. In: 18<sup>th</sup> International Sunflower Conference. February 27, March 1, 2012. Mar del Plata, Buenos Aires (AR): Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR) and International Sunflower Association (ISA).

- Moreno, M. V., Nishinakamasu, V., Loray, M. A., Alvarez, D., Gieco, J., Vicario, A., *et al.* (2013). Genetic characterization of sunflower breeding resources from Argentina: assessing diversity in key open-pollinated and composite populations. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 11(3), 238–249.
- Moreno, M. V., Buffa, E., Passeti, J., Cordes, D., Alvarez, D., Di Rienzo, J., *et al.* (2014). *Fenotipificación de líneas endocriadas de girasol (Helianthus annuus L.) en respuesta a estrés hídrico temprano con perspectivas para su empleo en mapeo de asociación*. En: XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 21 al 24 de septiembre de 2014. Mar del Plata, Buenos Aires (AR).
- Nagaraj, G. (Ed.) (2009). Cultivated Oilseeds. In: *Oilseeds: Properties, Products, Processing and Procedures*. New Delhi (India): New India Publishing. Cap. 2 (pp. 7-166). Disponible en [https://books.google.com.ar/books?id=9Q2pT8fqWKMCandprintsec=frontcoverandhl=esandsource=gbs\\_ge\\_summary\\_randcad=0#v=onepageandqandf=false](https://books.google.com.ar/books?id=9Q2pT8fqWKMCandprintsec=frontcoverandhl=esandsource=gbs_ge_summary_randcad=0#v=onepageandqandf=false). Consultado el 02-07-17.
- Nardini, A. and Salleo, S. (2005). Water stress-induced modifications of leaf hydraulic architecture in sunflower: co-ordination with gas exchange. *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3093–3101.
- Nardini, A., Salleo, S. and Andri, S. (2005). Circadian regulation of leaf hydraulic conductance in sunflower (*Helianthus annuus* L. cv Margot). *Plant Cell and Environment*, 28(6), 750–759.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Amer Nat*, 106, 283 – 292.
- Nei, M. (1978). *Molecular evolutionary genetics*. New York (USA): Columbia University Press. 512 p.
- Paniego, N., Echaide, M., Muñoz, M., Fernández, L., Torales, S., Faccio, P., *et al.* (2002). Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*, 45(1), 34–43.
- Paniego, N., Heinz, R., Fernández, P., Talia, P., Nishinakamasu, V. and Hopp H. E. (2007). Sunflower. In: Kole, C. (Ed.). *Genome mapping and molecular breeding in plants: Oilseeds*. Heidelberg (Germany): Springer-Verlag Berlin. Vol. 2. Cap. 4 (pp. 153-177).
- Pashley, C. H., Ellis, J. R., McCauley, D. E. and Burke, J. M. (2006). EST databases as a source for molecular markers: Lessons from *Helianthus*. *Journal of Heredity*, 97(4), 381–388.
- Pereyra-Irujo, G. A., Velázquez, L., Granier, C. and Aguirrezábal, L. A. N. (2007). A method for drought tolerance screening in sunflower. *Plant Breeding*, 126(4), 445–448.

- Pereyra-Irujo, G. A., Velázquez, L., Lechner, L. and Aguirrezábal, L. A. N. (2008). Genetic variability for leaf growth rate and duration under water deficit in sunflower: Analysis of responses at cell, organ, and plant level. *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 2221–2232.
- Pham, J. L., Glaszmann, J. C., Sano, R., Barbier, P., Ghesquiere, A., and Second, G. (1990). Isozyme markers in rice: genetic analysis and linkage relationships. *Genome*, 33, 348–359.
- Poormohammad Kiani, S., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A. *et al.* (2007). Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science*, 172(4), 773–787.
- Poormohammad Kiani, S., Maury, P., Sarrafi, A. and Grieu, P. (2008). QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Plant Science*, 175(4), 565–573.
- Poormohammad Kiani, S., Maury, P., Nouri, L., Ykhlef, N., Grieu P. and Sarrafi A. (2009). QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding* 128(4), 363–373.
- Prieto Angueira, S., Vega, C. R. C. y Chimenti, C. A. (2007). *Variabilidad intraespecífica en eficiencia del uso del agua en soja [Glycine max (L.) Merrill]*. En: Workshop Internacional Ecofisiología Vegetal Aplicada al Estudio de la Determinación del Rendimiento y la Calidad de los Cultivos de Granos. Primer Encuentro Red de Raíces de Ecofisiología SECyT. 6 y 7 de septiembre de 2007. Mar del Plata, Buenos Aires (AR): FA-UBA, INTA y FCA-UNMdP. p 86-87.
- Prieto Angueira, S., Vega, C. R. C. y Chimenti, C. A. (2011). *Respuesta de la tasa transpiratoria a cambios en el déficit de presión de vapor en condiciones hídricas contrastantes en genotipos de soja de diferente eficiencia transpiratoria*. En: Quinto Congreso de la Soja del Mercosur. Primer Foro de la Soja Asia-Mercosur. 14 al 16 de septiembre. Rosario, Santa Fe (AR): Bolsa de Comercio de Rosario.
- Quillet, M. C., Madjidian, N., Griveau, Y., Serieys, H., Tersac, M., Lorieux, M. and Bervillé, A. (1995). Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. *Theor Appl Genet*, 91(8), 1195–1202.
- Rieseberg, L. H., Choi, H., Chan, R. and Spore, C. (1993). Genomic map of a diploid hybrid species. *Heredity*, 70(3), 285–293.
- Rossi, R.O. (1997). *Girassol*. Curitiba, Paraná (BR): Tecnoagro Ltda. 333 p.

- Sadok, W. and Sinclair, T. R. (2010). Transpiration response of “slow-wilting” and commercial soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes to three aquaporin inhibitors. *Journal of Experimental Botany*, 61(3), 821–829.
- SAS (2016). SAS University Edition 3.6. SAS Institute Inc.
- Schilling, E. E. (2006). Helianthus. In: *Flora of North America Committee* (Ed.). Vol. 21, (pp.141-169).
- Seiler, G. and Jan, C-C. (2010). Basic Information. In: Hu, J. et al. (Eds.). *Genetics, genomics and breeding of sunflower*. New Hampshire (USA): Science Publishers. Cap 1 (pp.1-50).
- Sinclair, T. R., Zwieniecki, M. A. and Holbrook, N. M. (2008). Low leaf hydraulic conductance associated with drought tolerance in soybean. *Physiologia Plantarum*, 132, 446–451.
- Song, X-L., Sun, X-Z. and Zhang, T-Z. (2006). Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 3(3), 163–169.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology. Annals of Botany* (3th ed.). Sinauer Associates. 673 p.
- Talia, P., Nishinakamasu, V., Hopp, H. E., Heinz, R. A. and Paniego, N. (2010). Genetic mapping of EST-SSRs, SSR and InDels to improve saturation of genomic regions in a previously developed sunflower map. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(6).
- Tang, S., Yu, J. K., Slabaugh, M. B., Shintani, D. K. and Knapp, S. J. (2002). Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor Appl Genet*, 105(8), 1124–1136.
- Tang, Z. X., Wang, X. F., Zhang, M. Z., Zhang, Y. H., Deng, D. X. and Xu, C. W. (2013). The maternal cytoplasmic environment may be involved in the viability selection of gametes and zygotes. *Heredity*, 110(4), 331–337.
- Tanner, C.B. and T.R. Sinclair. (1983). Efficient water use in crop production: Research or Re-Search? In: Taylor, H. M. et al. (Eds.). *Limitations to Efficient Water Use in Crop Production*. Madison, WI (USA): ASA, CSSA, and SSSA. Cap 1A (pp 1-27).
- Trápani N., López Pereira M., Sadras V. O. y Hall A. J. (2003). Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en girasol. En: Pascale, A. J. (Ed.). *Producción de granos: Bases funcionales para su manejo*. Buenos Aires (AR): Universidad Nacional. Facultad de Agronomía. Cap. 10 (pp. 203 – 241).
- Turner, N. C., Schulze E. D. and Gollan. T. (1984). The responses of stomata and leaf gas exchange to vapour pressure deficits and soil water content. I. Species comparisons at high soil water contents. *Oecologia*, 63, 338-342.

- Turner, N. C., Schulze, E.-D., and Gollan, T. (1985). The responses of stomata and leaf gas exchange to vapour pressure deficits and soil water content II. In the mesophytic herbaceous species *Helianthus annuus*. *Oecologia*, 65, 348–355.
- USDA (2017). United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Office of Global Analysis. Oilseeds: World Markets and Trades. Current Reports: June 2017. Disponible en <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>. Consultado el 10-06-17.
- Varshney, R. K., Graner, A. and Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48–55.
- Vásquez, A. (2002). Mejoramiento genético. En: Díaz-Zorita, M. y Duarte, G. A. (Eds.). *Manual práctico para el cultivo de girasol*. Buenos Aires (AR): Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR). Hemisferio Sur S. A. (pp. 63 – 76).
- Vega, C. R. C., Andrade, F. H. and Sadras, V. O. (2001). Reproductive partitioning and seed set efficiency in soybean, sunflower and maize. *Field Crop Research*, 72, 163–175.
- Velázquez, L., Alberdi, I., Paz, C., Aguirrezábal, L. and Pereyra Irujo, G. (2017). Biomass allocation patterns are linked to genotypic differences in whole plant transpiration efficiency in sunflower. *Frontiers in Plant Science*, 8(1976), 12 p.
- Wang, C., Zhu, C., Zhai, H. and Wan, J. (2005). Mapping segregation distortion loci and quantitative trait loci for spikelet sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetical Research*, 86(2), 97–106.
- Wang, G., He, Q. Q., Xu, Z. K. and Song, R. T. (2012). High segregation distortion in maize B73 x teosinte crosses. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), 693–706.
- Xu, Y., Zhu, L., Xiao, J., Huang, N. and McCouch, S. R. (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F<sub>2</sub>, backcross, doubled haploid and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics*, 253(5), 535–545.
- Yan, J. B., Tang, H., Huang, Y. Q., Zhang, Y. L., Li, J. S. (2003) Genetic analysis of segregation distortion of molecular markers in maize F<sub>2</sub> population. *Acta Genetica Sinica* 30, 913–918.
- Yang, J., Zhao, X., Cheng, K., Du, H., Ouyang, Y., Chen, J., *et al.* (2012). A killer-protector system regulates both hybrid sterility and segregation distortion in rice. *Science*, 337, 1336–1340.
- Zhao, B., Deng, Q.-M., Zhang, Q.-J., Li, J.-Q., Ye, S.-P., Liang, Y.-S., *et al.* (2006). Analysis of Segregation Distortion of Molecular Markers in F<sub>2</sub> Population of Rice. *Acta Genetica Sinica*, 33(5), 449–457.

- Zhu, C., Wang, C. and Zhang, Y. M. (2007). Modeling segregation distortion for viability selection. I. Reconstruction of linkage maps with distorted markers. *Theor Appl Genet*, 114(2), 295–305.
- Zubrzycki, J. (2014). *Estudio de la resistencia a Sclerotinia sclerotiorum en líneas endocriadas de girasol*. (Tesis inédita de Doctorado). Buenos Aires (AR): Universidad Nacional. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 208 p.
- Zubrzycki, J. E., Maringolo, C. A., Filippi, C. V., Quiróz, F. J., Nishinakamasu, V., Puebla, A. F., et al. (2017). Main and epistatic QTL analyses for sclerotinia head rot resistance in sunflower. *PLoS ONE*, 12(12), 1–24.
- Zuil, S. (2011). *Girasol: estados fenológicos*. Reconquista, Santa Fe (AR): INTA - EEA. Disponible en <https://inta.gob.ar/documentos/girasol.-estados-fenologicos>

### 13. ANEXO

#### 1. Protocolo modificado de extracción de ADN con CTAB (Doyle y Doyle, 1987)

- a) Pesar 0,01 g de material verde o liofilizado en un tubo *eppendorf*.
- b) Agregar 800 µL de buffer de extracción y vortexear e incubar a 65°C durante 40-50 min. Volver a vortexear una vez más durante la incubación.
- c) Agregar 600 µL de cloroformo-octanol (24:1) y mezclar fuertemente por agitación manual.
- d) Centrifugar 10 min a 14.000 rpm y trasvasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
- e) Agregar 600 µL de cloroformo-octanol (24:1) y mezclar fuertemente por agitación manual.
- f) Centrifugar 10 min a 14.000 rpm y trasvasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
- g) Agregar 0.6 vol. de isopropanol frío (-20°C) y mezclar suavemente por inversión.
- h) Centrifugar 5 min a 13.000 rpm y descartar el sobrenadante.
- i) Agregar 500 µL de Etanol 70% frío (-20°C). Lavar por inversión y descartar el alcohol.
- j) Agregar 250 µL de Etanol 100% frío (-20°C). Lavar por inversión y descartar el alcohol.
- k) Agregar 500 µL de NaCl 2M y resuspender el pellet.
- l) Incubar a 65°C durante 40 min. Retirar y tratar de resuspender el pellet lo mejor que se pueda. Si hace falta colocar unos minutos en heladera (4°C) para que baje la temperatura (10 min.).
- m) Centrifugar 10 min a 2.000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- n) Agregar 0.6 vol. de isopropanol frío (-20°C) y centrifugar 5 min a 13.000 rpm.
- o) Descartar el sobrenadante y agregar 500 µL de Etanol 70% frío (-20°C). Lavar por inversión y descartar el alcohol.
- p) Agregar 250 µL de Etanol 100% frío (-20°C). Lavar por inversión y descartar el alcohol.
- q) Dejar secar los tubos destapados a temperatura ambiente toda la noche.
- r) Agregar 50-100 µL de *buffer* TE.
- s) Agregar 1 µL de RNasa e incubar 1 h a 37°C.
- t) Hacer un gel de agarosa 0,8% y chequear la calidad del ADN.



## 2. Protocolo modificado de tinción con Nitrato de Plata (Creste *et al.*, 2001).

- a) **1º Fijación:** 10 min en agitación en solución fijadora.
- b) **1º Lavado:** 1 min en agitación con agua destilada.
- c) **Pre-tratamiento:** 3 min en agitación con ácido nítrico.
- d) **2º Lavado:** 1 min en agitación con agua destilada.
- e) **Tinción:** 15 min en agitación con nitrato de plata.
- f) **3º Lavado:** 10 s en agua destilada.
- g) **1º Revelado:** con Hidróxido de Sodio en agitación durante 30-40 s.
- h) **2º Revelado:** con carbonato de sodio (frío a 4°C), en agitación hasta que aparezcan las bandas.
- i) **2º Fijación:** 5 min en agitación con solución fijadora.
- j) **4º Lavado:** 5 min en agitación con agua destilada.

### Soluciones utilizadas:

Soluciones de trabajo	Componentes	Concentración
Sn. 1º Fijador	Etanol absoluto	100 mL
	Ácido Acético	10 mL
Sn. Pre-tratamiento	Ácido Nítrico	15 mL
Sn. Tinción	Nitrato de Plata	2 g
Sn. 1º Revelado	Hidróxido de Sodio	15 g
	Formaldehído	540 uL
Sn. 2º Revelado	Carbonato de Sodio	30 g
	Formaldehído	540 uL
Sn. 2º Fijador	Ácido Acético	50 mL

**Nota:** Enrazar las soluciones a 1 L con agua bidestilada.

**Tabla 1:** Lista de marcadores SSR utilizados en la genotipificación de las siete líneas parentales.

Serie	Nº Cebador	GL	Foward	Reverse	Tamaño esperado	Motivo	Tipo marcador	Nº alelos/locus
HA	102		CCTCAAAACACATCTCCCTCTC	GAAGAGGGGTGAGGGTGAAGAGG	160	GA	M	1
HA	196		GGTGTTAGAGTAAAGTATGCC	GAGGGGTTTCCTTTTACG	176	GA-G	NA	
HA	293	14	GGGGACATCTCCCGTCCACC	CCTCATCCATCTCCATCCAATC	122	GA	P	3
HA	360	16	CTCACCCCTTCATCTCCTTC	CAACAAGGAACCGATAACTG	194	GA	NA	
HA	432	4	GGGTTTAGTGCCAGTAGTTGTC	CTTTATCCCCACCCCTCC	168	GT	H	
HA	557		CACCATCATTCACCAACCAC	CGTCGTCGCTATTACCGTC	193	GT	H	
HA	729		CCAATATCACCATCATTCACC	CTATTCACCGTCCCCATAGG	131	GT	M	1
HA	749		GGCTAACTGAAACATGGG	GGCTGCTGGAGTGAAGTCC	131		P	2
HA	790		GCAACCGGAGAGTGAGGTGG	CTCATATCTCCGCGGATATCG	152	TGG	P	2
HA	806		GATGTTCTTCCTGCAC	GGTTGGATAATGGGCGAGC	191	GA-GT	P	2
HA	911	8	CAAAGTTCACCTCGTTTTTC	AAGTGGGAAGGTCTACGAGT	179	GA	P	2
HA	920	10	CCCCATGTAATCGCTTTAG	GTGGGGATATAGTGTTCCGGC	176		P	2
HA	928	10	CCTTTGTAGTCCCTTACTGG	GGTCGATCATGTATGCGTGTTG	217		P	4
HA	969		CAGTTCTCACTTGTGA	CATCAATAAGTGGAAGACGGG	168	TGG	NA	
HA	991	4	GCCCCCTTGATGCCCTTTTC	GAATCGCCATTTGAATCGCCAG	148	GA	P	2
HA	1066		GCATCACTAGGTATTAGG	CGAGCGGGAAATGCAATATTGG			Multilocus	
HA	1108	10	GGACCTTCTATTTAGGAGGG	GGGAACATGGAATAAGGG	185	ATT	NA	
HA	1155	12	CAATCAAAACATGTGTATGTG	GGATTCTGCTGAAAGGAGACAAC	110	GA-GT	NA	
HA	1287		GATATGAGCCCATCACTCATC	GAAGATATGTCAGGTCACACCC	222		P	5
HA	1402	17	GTGTGAATGTGAGTGTGAATCC	GTCACAGTTGCATATCCATCC	167		P	2
HA	1449		CATGCACACGTACCATCTTAC	GGTTCCTTAGATGTCTATGGGC	214		M	1
HA	1752		CCTTCTTCCTCAAATCCCG	CGTCATTGTCTATTGAGAAGATCG	147	ATC	P	2
HA	1848	7	CATCCCCTTCTGAATAGAAA	TAGGCTCGTTAAACTTACGG	196	GT	P	5
HA	1938		CCAAAATCGTCGACCTTGCGAC	CGAGAGGGAATGTCATTTTTG	230	ATT	NA	
HA	2053	9	CACCATCACCCACCTGCACAAG	CATCAAAGCCCATTCTCAGCCC	185		P	4
HA	2057		CACACATCTCTTCTCATACTC	GAATCCATCTTTGTAGCTGACCC	143	ATT	Duplicado	2
HA	2063	9	CACCGCAGATGGCCAATTCAAC	GGTTCTGCTAACCTGCAATGCG	173	GA-GT	P	2
HA	2077	14	GATAAGGTTTTCTCTCTCCC	GAGAAAAATGAGCTGATACCG	130	GA	P	4
HA	2078		GATGGCAAGGTGTTGCAGAATTG	CAACACACACACTCTCAATACCC	154		P	2
HA	2145		CCCATCGTATAGAAGGGGTTG	CACAGGTTTTGCTACGTCCTCC	223	GA	P	3
HA	2147	4	CCCATAAACATTTACACCC	CCTGAGAAAACGGTAGATAGTG	73	GA	P	3
HA	2178		GAAGTACCACCTCCATCTCCACC	CACGTAGTACCTCCCCATACTTG	154	GA	P	3

Serie	Nº Cebador	GL	Foward	Reverse	Tamaño esperado	Motivo	Tipo marcador	Nº alelos/locus
HA	2191	16	GGCAACTCAATATCCACACCCC	GGGTTCTTCAAGGAGAATGTGAC	211	GA	P	4
HA	2193	16	CAATACACGCAACCCCCGAAC	GCACTGCCAAAACAGTTGAC	132	GA	P	3
HA	2237		CAACTAACGAACACATGACAC	CATCTTCGAAAACAAGCTCATC	130	TA	NA	
HA	2265		GCTACACGAGCCATCTTGAAC	GATTACAAGCACAGATGTCAC	261	ATT	P	4
HA	2272		CAATTTTCATTCTTGAGATGAGG	CACAATTGTATTTAAAGCGAC	262	ATT	Multilocus	
HA	2348		ACCAAGTTTAAAAGCC	GAAAATGGTAGTGCGAAGGG	283	GT-AT	NA	
HA	2448		GAGGATATATTTTCCCTCCCCTG	CTACACTTTTGAACAAGAGTAG	244	GT-AT	P	3
HA	2499		GATATCTTATCACCTTCCTGC	GTTCCAACTGACACAGCTTC	142	GTA	P	2
HA	2500		CAAACCTCACACCATCCGTGTGG	GGAAATTGCAGGTGTGTGATG	143	ATC	P	2
HA	2547		CAATCATCAGCATCAGCAACC	CTGCATACGTGTGTATATGC	142	GA-TA-GT	P	3
HA	2579	10	CGGATTTATGATTTGATTCACCCG	GGATAACACTACCTTTGATGTTG	180		P	3
HA	2605	8	GCAGATTACAATATGCACAC	GTGTTGAAAGTAGTTGGTTGC	95	GA	P	2
HA	2714	14	CCCTAGTGTATAGCAACCTTTC	GTAGTGTGTATGAGGGAGATGG	223	GA-G	M	1
HA	2719		GGCGCCACAGCCATTTTCTG	GACCGAATTCTAGTGAGCCGC	243		P	2
HA	2877		CCGACAAGGGAATTGTTATG	GGTTACGCACTTAATCAGTC	87	ATG	H	
HA	2905		GCTCATCATTCTCTAACACAC	CTTCCAAGAGCTCCTAGCTTC	165		P	2
HA	2920	3	AACGTGTTTCATTCCGGATGC	GAAGATTGGTATGATGGGGC	173		P	3
HA	2946		GGGCTGGTTTTCATTTTAGTG	CCAATCCTTGAGCAAATCAG	134	GT	P	3
HA	3070		CTTTTCAATTCCTGCTCATCCC	GGGATGAGCTCTGTCTTTTCGC	120	GA	P	2
HA	3204	10	GCCCTTCAATCCTACCATTAAC	GGATATTGAGTTGGTTGTTGGG	121	ATC	P	2
HA	3239	2	CTTAATTCGACATAAGCAGG	CTTTCATTATTCACAACCCCC	149	ATG	P	3
HA	3272	7	TGTTCTCACACTTTTACCA	TAGGCCCTTAAATTCAGATG	123	TA-GA	P	4
HA	3288		GCATTAGTGAAGGTGGAAAG	AGGTCTTCAAACATGCAAAC	176	GA	P	3
HA	3298		CATCCAAATCGAGCGCATTG	GGAAGGATGATAGTTAGGG	137	ATC	P	2
HA	3312	6	ACATCACAACCTAATCCCC	TACTGATGGTGTGTTATGAG	110	GA	P	2
HA	3330	13	GGCTGAGTAAATGCCAAATACGG	GGTTGTTGATTACAAGCTCTCC	149	GA	P	4
HA	3348		GGTCGCACGTTAAAAGGTATTG	TTCAAACGTCGACACATGAAC	208	GT-GA-A	P	4
HA	3349		GGGAATCTAACTTCTATCACC	CGTATCCGGAGCATAATATGGAG	270	GT	NA	
HA	3373		GCGGCGAAGAAGAAATTGAGG	GGAAAGGGTTCCTGTTCTCC	186	GT	P	3
HA	3555	12	GATATCTCTCATAAGTGCCG	GGTCTTGTGATGACGAAGC	103	CAT	P	2
HA	3582	16	TGACCTTAATCCTTGAGAG	CCTCTAATTCGAAAACCTAAC	121	ATG	P	2
HA	3627	5	GATGAAATGCCTCACAGACT	CATTGAAGATTGATGGATGA	179	GT	P	3
HA	3632		GTGAGACTCCCAAAAGTTAG	GGGTCTTCATTAATTGCTC	209	GA	P	5
HA	3691		GAATGAAGCATGTGGAAGGCGG	GTGGAGGTGATGATGGTATGAG	261	ATT	P	2
HA	3703	4	CAAATGCTGATTCCACACTA	ATGGTTTCCTGTTTGAATTG	217	GA	P	2
HA	3886	14	GCTTATGTGGAAGCATGTCCG	CAGGTTTCTACTTACGGGTCG	188	ATT	P	3
HA	3938	3	GTCAGTAAAAAGTTACCATGTTGC	GCTTGAAGATATAAAGTTGTTGC	225	ATT	NA	

Serie	Nº Cebador	GL	Foward	Reverse	Tamaño esperado	Motivo	Tipo marcador	Nº alelos/locus
HA	4011	13	ACTTCTACCCTCCCCTTCTT	CTGTACACGTGCTGCTTTAG	224		P	6
HA	4057	3	AAACCCCTCCGACTTATCTC	TAAAGAGAGAGCCCAACAAG	172	GT	P	5
HA	4103	6	TCACCTATCACCAATCTCATCCA	CTGTCTCAAATCGGGTGGTT	190	GA	P	2
HA	4113		ATGCACTTGGAATTTCTTTG	CTTCCATAACCTCACCATGT	139	GA	NA	
HA	4149	17	TCAATTCATCGTGCATATCG	CCAAAGTCCACCAAATCTTCC	111	GA	P	3
HA	4239	15	GAATGATAGTGAATTGAGACAGG	CTGGCATCTATATCCATGGATAG	116	ATT	P	2
HT	292	3	ACTGTCAACACCTCCTCGACT	GGCTTACACTTCTCTCCATCTCAA	334	TC	P	2
HT	375	4	GCTGAAAACGGGTCAATAAAGTC	TGAAGAAATGCTTCCAATCTGA	403	TA	P	3
HT	382	13	GAAGTCTGCTTTGGTGTGGTC	ATGGCTCTCTCATTTCCACTTG	359	AGG	P	2
HT	426	11	AACCGTAAATGAAATCGGTGTG	GAGGGCAAAGTTGGGATACTCT	321	TA	P	3
HT	440	5	GAAGTTGGGAGGGTTGTTCAAG	CCTCCTGTTGGAACACCAAAT	239	AGG	P	4
HT	519	8	TTTCGTGACCGAGAAAGGTAT	TGTGGCATAACATAGAAATGATCTAA	267	AT	P	4
HT	586	15	TGAACTCTTGTTGGCATCT	AAATGTGGATTTATGTATCTCAGTAA	320	TTAA	P	3
HT	734	3	GTTTCGCAGCTCTAGCATTGA	CCCCCTACAAGGCAACAAAATA	298	TA	P	2
HT	761	2	GGTGGGTGTTTGATTTTGTGTG	TCTCCTCTCTCCCTTTGTCTGC	126	TG	P	2
HT	974	1	AAAGGCGATTGAGTTTTTCGAT	GCAAGAATGAAAGGCCAACTTTA	173	GT	P	2
HT	998	17	CATGTCCCGATCAAAGAGTTGT	CCATATCCTGGTTGTTGTGGAG	376	CAA	P	2
ORS	16	7	GAGGAAATAAATCTCCGATTCA	GCAAGGACTGCAATTTAGGG	138		P	3
ORS	59		GCTTCGTAGCTTTCTTCTTCGC	AAGTAGCTTCGCAAGTATTCGG	167		M	1
ORS	229	2	TCCGACCCGAATCTTATGAACC	GACCCGAATGAGACCCAAACTG	176		P	3
ORS	297	17	TGCAAAGCTCACACTAACCTG	GTGTCTGCACGAACTGTGGT	225		P	3
ORS	316	13	TGGCGTCTTCATAGCATCAG	GAGATTTGAGCTTCGTGTTGC	189	AC	P	3
ORS	342	2	TGTTCATCAGGTTTGTCTCCA	CACCAGCATAGCCATTCAAA			NA	
ORS	349	6	CCCTAACCAATATGCTCCCAT	TGGATAAACGAGTGAATGGTGT	263		M	1
ORS	354	11	TTATCAACCATGACCGCATC	AAATTTTCTTCTCAAATGAACCTC	161		P	2
ORS	371	1	CACACCACCAACATCAACC	GGTGCCCTTCTCTTCCCTGTG	254		P	2
ORS	420	15	TCATGGTGTTTGGTTTGTGTC	TGCCAAATTCCTCTTCTTTCT	138	GT	P	2
ORS	423	2	TCATATGGAGGGATCTGTTGG	AAGCAACCATAATGCATCAGAA	240	GT	NA	
ORS	457	11	TGCATACCCAATCTACCAGCTA	AAGACGAAGGTGCAACCAGT	230	AC-CT	P	3
ORS	460	7	ACTCGGCTACCACTCACAC	GCCCTTTGACCCTAACCAAG	290		P	5
ORS	483	6	CCGAACAACAATCTCCACAA	GGTTTAGGTGTGCGCATCACA	271	GT	P	2
ORS	510	9	CATCGCGTCCCTCTCTCTAA	CCAACCATCACAGCAATCAG	255	GT	P	2
ORS	534	13	TCCAAACTCTCTCCCCCTCT	GCAGCGAAATAGGAAAAACG	252		NA	
ORS	561	17	CTTTGCACGTTGGTCATCAT	ACCAGCACCTTCTCAACTG	382		P	2
ORS	607	11	CTAATACAAAGCAACCCGACAA	GCCTGCACATGAGAATGACA	275	AG	M	1
ORS	613	10	GTAAACCCTAGGTCAATTTGCAG	ATCTCCGGAAAACATTCTCG	228	AG	P	3
ORS	623		CTCCGTGACATCCAGACAACT	GACCGGCCACACCCTAAA	230		M	1

Serie	Nº Cebador	GL	Foward	Reverse	Tamaño esperado	Motivo	Tipo marcador	Nº alelos/locus
ORS 665		16	GCACATGAGGTATGGATCTCCT	TGCAAATACAACCTCGGGAAA	287		P	3
ORS 687		15	ACCGTTACACTTATTGGTTATTTTCATT	GGGGTTTGTGTTCTGTTTTG	168	CT	P	2
ORS 727		17	GGTGGCAAGTGGTGGTTAGA	AAAGCTGGTCATCTCAAGGGTA	192	AG	P	5
ORS 799		13	TCCAGCAAGTCAGCAACAAC	ACTCCCTCCCATTCTCGTCT	143	CT	P	2
ORS 810		12	TTCAACGTGCGTGATTAAGG	GCGATTTCTTTGGAGACGAA	398	CT	M	1
ORS 844		9	ACGATGCAAAGAATATACTGCAC	CATGTTTAATAGGTTTAAATTCTAGGG	307	AC	P	4
ORS 878		10	TGCAAGGTATCCATATTCCACAA	TATACGCACCGGAAAGAAAGTC	203	AC	P	2
ORS 887		9	TCGAAAACGACTAATCCAACCTTTC	GAGCATGAACAAGAATTGACACA	252	AC	P	3
ORS 894		8	TTTCCTCATGATCCCGATTCTAT	TGCATTACCTAATTTCTAGTGGGTTT	252		NA	
ORS 899		16	GCCACGTATAACTGACTATGACCA	CGAATACAGACTCGATAAACGACA	323	AC	P	3
ORS 959		1	CCGCTAAGTATAAACC GCCTATT	CGTCCTCTTCGCATCAATCTTAT	240	GT	P	4
ORS 993		16	GTGTTACAATCCTTGCGTCGATA	CAAACCACAGGGACCAAAATG	330		P	3
ORS 1024		5	GGGAAGTGGGCTTGCTATGTAT	AACACACCGAAATCACCTATGAA	224	AG	P	4
ORS 1041		7	AAACAAACCTTAATGGGGTCGTA	ATATTGGCTGGTTGATGCTGAT	276		P	2
ORS 1065		2	ACCGCTGTCAACACCTTAAACTC	GGCTGGGAATCAACTGCTACTAC	295	CT	NA	
ORS 1085		12	GACCTCAAGGCATGCTAACACTC	ACTAAGTGTGTGGACGGGGAAA	280	CT	M	1
ORS 1093		1	CATATATGTGGGTCGCATATAACC	CCTGTGGATCTTTCTAGCAACAA	386	AG	NA	
ORS 1146		11	GGCTCATCACTTG CATCTATTGT	TGAAGACACCATCTCCAATGC	379	AG	P	2
ORS 1222		3	GGCATTGTTGT CATTT CATCTCT	ATCATGTGCGGAATAGCTTGTGA	441	CT	P	3
ORS 1247		17	GTCTCGACTTGGGATCTGCTG	AGTGTGAGGGTGTGTAGGATTGA	339	CT	P	2
ORS 1265		9	GGGTTTAGCAAATAATAGGCACA	ACCCTTGGAGTTTAGGGATCA	222	CT	P	3

**GL:** Grupo de Ligamiento; **M:** monomórfico; **P:** polimórfico; **NA:** No Amplificó; **H:** heterocigota.

**Tabla 2:** Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación por genotipo de las variables evaluadas.

Variable	Genotipo	n	Media	D.E.	CV
<b>EUA (g g<sup>-1</sup>)</b>	R 423	12	0,0048	0,0006	13,24
	B 59	12	0,0045	0,0007	15,98
	HA R4	12	0,0043	0,0008	17,91
	HA 64	12	0,0042	0,0010	23,39
	R 432	12	0,0042	0,0007	16,08
	HA 89	12	0,0040	0,0007	17,62
	R 419	12	0,0039	0,0006	14,18
<b>GAF (cm<sup>2</sup>)</b>	B 59	12	502,72	109,16	21,71
	HA 64	12	368,27	83,02	22,54
	HA 89	10	316,36	66,91	21,15
	HA R4	12	280,32	45,12	16,10
	R 432	12	273,81	38,69	14,13
	R 423	12	217,32	74,25	34,16
	R 419	12	162,43	100,39	61,80
<b>Pendiente TT</b>	HA 64	12	0,21	0,05	21,96
	R 432	12	0,20	0,02	10,60
	HA R4	12	0,19	0,02	9,06
	R 423	12	0,19	0,02	11,27
	B 59	12	0,17	0,02	10,34
	R 419	12	0,13	0,02	16,10
	HA 89	12	0,12	0,01	10,66
<b>Punto C</b>	R 419	12	2,84	0,16	5,65
	HA 89	12	2,82	0,22	7,94
	HA R4	12	2,46	0,10	3,87
	R 423	12	2,37	0,03	1,24
	B 59	12	2,32	0,08	3,31
	HA 64	12	2,22	0,17	7,61
	R 432	12	2,17	0,13	5,85
<b>TAN (g cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	R 423	12	0,0014	0,0002	11,53
	B 59	12	0,0012	0,0001	7,07
	HA 64	12	0,0012	0,0002	17,02
	HA R4	12	0,0012	0,0002	13,16
	HA 89	12	0,0011	0,0001	12,73
	R 432	12	0,0011	0,0001	8,61
	R 419	12	0,0010	0,0001	12,64
<b>Transpiración (g)</b>	B 59	12	2524,00	554,20	21,96
	HA 64	12	2322,50	352,55	15,18
	HA 89	10	2313,40	311,49	13,46

Variable	Genotipo	n	Media	D.E.	CV
Transpiración (g)	HA R4	12	2225,75	536,00	24,08
	R 423	12	2206,67	264,49	11,99
	R 432	12	2111,25	243,11	11,52
	R 419	12	1685,75	399,72	23,71

**EUA:** Eficiencia en el Uso del Agua; **GAF:** Ganancia de Área Foliar; **TAN:** Tasa de Asimilación Neta; **n:** número de individuos; **D.E.:** Desvío Estándar; **C.V.:** Coeficiente de Variación.

**Tabla 3:** Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación por tratamiento de las variables evaluadas.

Variable	Tratamiento	n	Media	D.E.	CV
EUA (g g <sup>-1</sup> )	CC	42	0,0037	0,00054	14,51
	EH	42	0,0049	0,00045	9,17
GAF (cm <sup>2</sup> )	CC	40	333,90	143,94	43,11
	EH	42	273,00	104,37	38,23
Pendiente TT	CC	42	0,18	0,04	20,10
	EH	42	0,17	0,04	25,33
Punto C	CC	42	2,52	0,31	12,30
	EH	42	2,39	0,25	10,34
TAN (g cm <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	CC	42	0,0011	0,00017	15,64
	EH	42	0,0012	0,00014	11,72
Transpiración (g)	CC	40	2483,95	441,15	17,76
	EH	42	1921,12	257,56	13,41

**EUA:** Eficiencia en el Uso del Agua; **GAF:** Ganancia de Área Foliar; **TAN:** Tasa de Asimilación Neta; **CC:** Capacidad de Campo; **EH:** Estrés Hídrico; **n:** número de individuos; **D.E.:** Desvío Estándar; **C.V.:** Coeficiente de Variación.

**Tabla 4:** Medias, desvíos estándar y coeficientes de variación por genotipo y por tratamiento de las variables evaluadas.

Variable	Genotipo	Tratamiento	n	Media	D.E.	CV
EUA (g g <sup>-1</sup> )	B 59	CC	6	0,0040	0,0007	18,20
		EH	6	0,0050	0,0002	4,26
	HA 64	CC	6	0,0033	0,0003	7,75
		EH	6	0,0051	0,0004	7,25
	HA 89	CC	6	0,0034	0,0002	6,90
		EH	6	0,0046	0,0004	8,83
	HA R4	CC	6	0,0036	0,0002	6,44
		EH	6	0,0050	0,0002	4,47
	R 419	CC	6	0,0036	0,0004	11,51
		EH	6	0,0043	0,0004	9,20
	R 423	CC	6	0,0044	0,0005	11,58

Variable	Genotipo	Tratamiento	n	Media	D.E.	CV
EUA (g g <sup>-1</sup> )	R 423	EH	6	0,0053	0,0005	9,47
	R 432	CC	6	0,0037	0,0004	10,59
		EH	6	0,0048	0,0003	5,34
GAF (cm <sup>2</sup> )	B 59	CC	6	541,12	143,95	26,60
		EH	6	464,31	44,20	9,52
	HA 64	CC	6	426,53	45,67	10,71
		EH	6	310,00	70,21	22,65
	HA 89	CC	4	369,07	68,13	18,46
		EH	6	281,22	39,60	14,08
	HA R4	CC	6	318,42	22,11	6,94
		EH	6	242,23	22,54	9,31
	R 419	CC	6	175,40	114,53	65,29
		EH	6	149,46	93,00	62,22
	R 423	CC	6	227,22	107,40	47,27
		EH	6	207,43	18,90	9,11
	R 432	CC	6	291,27	42,27	14,51
		EH	6	256,36	27,86	10,87
Pendiente TT	B 59	CC	6	0,17	0,02	9,84
		EH	6	0,16	0,02	11,40
	HA 64	CC	6	0,21	0,04	17,49
		EH	6	0,21	0,06	27,12
	HA 89	CC	6	0,13	0,01	5,87
		EH	6	0,11	0,01	10,47
	HA R4	CC	6	0,20	0,02	10,29
		EH	6	0,18	0,01	5,63
	R 419	CC	6	0,14	0,02	15,57
		EH	6	0,12	0,01	10,92
	R 423	CC	6	0,21	0,01	6,38
		EH	6	0,17	0,01	5,96
	R 432	CC	6	0,20	0,02	10,49
		EH	6	0,19	0,02	11,04
Punto C	B 59	CC	6	2,38	0,07	2,74
		EH	6	2,27	0,05	2,03
	HA 64	CC	6	2,27	0,13	5,94
		EH	6	2,17	0,20	9,02
	HA 89	CC	6	3,02	0,09	2,91
		EH	6	2,62	0,08	3,06
	HA R4	CC	6	2,46	0,08	3,12
		EH	6	2,46	0,12	4,80
	R 419	CC	6	2,90	0,21	7,36
		EH	6	2,78	0,04	1,61



Variable	Genotipo	Tratamiento	n	Media	D.E.	CV
Punto C	R 423	CC	6	2,38	0,03	1,29
		EH	6	2,37	0,03	1,19
	R 432	CC	6	2,25	0,13	5,85
		EH	6	2,09	0,06	2,64
TAN (g cm <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	B 59	CC	6	0,00116	0,00011	9,83
		EH	6	0,00120	0,00004	3,05
	HA 64	CC	6	0,00101	0,00009	8,90
		EH	6	0,00136	0,00009	6,54
	HA 89	CC	6	0,00100	0,00012	12,00
		EH	6	0,00111	0,00014	12,39
	HA R4	CC	6	0,00105	0,00012	11,36
		EH	6	0,00129	0,00005	4,20
	R 419	CC	6	0,00099	0,00014	14,33
		EH	6	0,00109	0,00011	10,08
	R 423	CC	6	0,00136	0,00020	14,78
		EH	6	0,00135	0,00012	8,56
	R 432	CC	6	0,00111	0,00010	8,81
		EH	6	0,00112	0,00010	9,21
Transpiración (g)	B 59	CC	6	2953,67	467,50	15,83
		EH	6	2094,33	118,64	5,66
	HA 64	CC	6	2558,50	363,05	14,19
		EH	6	2086,50	89,25	4,28
	HA 89	CC	4	2611,75	275,82	10,56
		EH	6	2114,50	101,55	4,80
	HA R4	CC	6	2648,33	436,33	16,48
		EH	6	1803,17	114,35	6,34
	R 419	CC	6	1976,00	365,87	18,52
		EH	6	1395,50	124,34	8,91
	R 423	CC	6	2388,17	268,56	11,25
		EH	6	2025,17	52,09	2,57
	R 432	CC	6	2293,83	211,33	9,21
		EH	6	1928,67	73,23	3,80

**EUA:** Eficiencia en el Uso del Agua; **GAF:** Ganancia de Área Foliar; **TAN:** Tasa de Asimilación Neta; **CC:** Capacidad de Campo; **EH:** Estrés Hídrico; **n:** número de individuos; **D.E.:** Desvío Estándar; **C.V.:** Coeficiente de Variación.

**Tabla 5:** Comparación de efectos simples por mínimos cuadrados medios para ganancia de área foliar (cm<sup>2</sup>), para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo.

Genotipo	Tratamiento		Estimador de la media	E.E.	g.l.	Prueba t	P<0,05
<b>B 59</b>	CC	EH	76,810	42,254	52,2	1,82	0,0748
<b>HA 64</b>	CC	EH	116,53	42,254	52,2	2,76	0,0080
<b>HA 89</b>	CC	EH	87,85	49,546	46,26	1,77	0,0828
<b>HA R4</b>	CC	EH	76,18	42,254	52,2	1,80	0,0772
<b>R 419</b>	CC	EH	25,93	42,254	52,2	0,61	0,5420
<b>R 423</b>	CC	EH	19,79	42,254	52,2	0,47	0,6414
<b>R 432</b>	CC	EH	34,90	42,254	52,2	0,83	0,4125

**CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico; **E.E.:** error estándar; **g.l.:** grados de libertad.

**Tabla 6:** Comparación de efectos simples por mínimos cuadrados medios para la transpiración total acumulada (g), para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo.

Genotipo	Tratamiento		Estimador de la media	E.E.	g.l.	Prueba t	P<0,05
<b>B 59</b>	CC	EH	859,40	146,82	68	5,85	<,0001
<b>HA 64</b>	CC	EH	471,87	146,82	68	3,21	0,0020
<b>HA 89</b>	CC	EH	487,01	178,27	68	2,73	0,0080
<b>HA R4</b>	CC	EH	844,97	146,82	68	5,76	<,0001
<b>R 419</b>	CC	EH	580,54	146,82	68	3,95	0,0002
<b>R 423</b>	CC	EH	363,18	146,82	68	2,47	0,0159
<b>R 432</b>	CC	EH	365,27	146,82	68	2,49	0,0153

**CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico; **E.E.:** error estándar; **g.l.:** grados de libertad.

**Tabla 7:** Comparación de efectos simples por mínimos cuadrados medios para tasa de asimilación neta ( $\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ), para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo.

Genotipo	Tratamiento		Estimador de la media	E.E.	g.l.	Prueba <i>t</i>	<i>P</i> <0,05
<b>B 59</b>	CC	EH	-0,00004	0,000067	70	-0,60	0,5509
<b>HA 64</b>	CC	EH	-0,00035	0,000067	70	-5,24	<,0001
<b>HA 89</b>	CC	EH	-0,00010	0,000067	70	-1,55	0,1261
<b>HA R4</b>	CC	EH	-0,00024	0,000067	70	-3,62	0,0006
<b>R 419</b>	CC	EH	-0,00010	0,000067	70	-1,47	0,1452
<b>R 423</b>	CC	EH	6,667E-6	0,000067	70	0,10	0,9207
<b>R 432</b>	CC	EH	-0,00001	0,000067	70	-0,17	0,8618

**CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico; **E.E.:** error estándar; **g.l.:** grados de libertad.

**Tabla 8:** Comparación de efectos simples por mínimos cuadrados medios para eficiencia en el uso del agua ( $\text{g g}^{-1}$ ), para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo.

Genotipo	Tratamiento		Estimador de la media	E.E.	g.l.	Prueba <i>t</i>	<i>P</i> <0,05
<b>B 59</b>	CC	EH	-0,00100	0,000266	59,14	-3,76	0,0004
<b>HA 64</b>	CC	EH	-0,00200	0,000266	59,14	-7,52	<,0001
<b>HA 89</b>	CC	EH	-0,00133	0,000266	59,14	-5,01	<,0001
<b>HA R4</b>	CC	EH	-0,00117	0,000266	59,14	-4,39	<,0001
<b>R 419</b>	CC	EH	-0,00067	0,000266	59,14	-2,51	0,0149
<b>R 423</b>	CC	EH	-0,00100	0,000266	59,14	-3,76	0,0004
<b>R 432</b>	CC	EH	-0,00150	0,000266	59,14	-5,64	<,0001

**CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico; **E.E.:** error estándar; **g.l.:** grados de libertad.

**Tabla 9:** Comparación de efectos simples por mínimos cuadrados medios para la pendiente de la relación Tasa Transpiratoria – Déficit de Presión de Vapor, para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo.

Genotipo	Tratamiento		Estimador de la media	E.E.	g.l.	Prueba $t$	$P<0,05$
<b>B 59</b>	CC	EH	0,0480	0,09065	62,74	0,53	0,5983
<b>HA 64</b>	CC	EH	-0,0401	0,08270	63,32	-0,49	0,6286
<b>HA 89</b>	CC	EH	0,1581	0,1046	61,67	1,51	0,1360
<b>HA R4</b>	CC	EH	0,0971	0,08614	62,41	1,13	0,2635
<b>R 419</b>	CC	EH	0,2024	0,1003	61,29	2,02	0,0480
<b>R 423</b>	CC	EH	0,2272	0,08675	61,4	2,62	0,0111
<b>R 432</b>	CC	EH	0,0637	0,08531	62,66	0,75	0,4579

**CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico; **E.E.:** error estándar; **g.l.:** grados de libertad.

**Tabla 10:** Comparación de efectos simples por mínimos cuadrados medios para el punto C de la relación Tasa Transpiratoria – Déficit de Presión de Vapor, para siete líneas de girasol bajo dos regímenes hídricos durante 16 días de estrés efectivo.

Genotipo	Tratamiento		Estimador de la media	E.E.	g.l.	Prueba $t$	$P<0,05$
<b>B 59</b>	CC	EH	0,0450	0,02419	64,76	1,86	0,0669
<b>HA 64</b>	CC	EH	0,0484	0,02419	64,76	2,00	0,0493
<b>HA 89</b>	CC	EH	0,1422	0,02419	64,76	5,88	<,0001
<b>HA R4</b>	CC	EH	-0,0028	0,02419	64,76	-0,12	0,9067
<b>R 419</b>	CC	EH	0,0413	0,02419	64,76	1,71	0,0924
<b>R 423</b>	CC	EH	0,0070	0,02419	64,76	0,29	0,7728
<b>R 432</b>	CC	EH	0,0720	0,02419	64,76	2,98	0,0041

**CC:** capacidad de campo; **EH:** estrés hídrico; **E.E.:** error estándar; **g.l.:** grados de libertad.

**Tabla 11:** Análisis de diversidad de 91 marcadores en siete líneas parentales de girasol.

Marcador	N	Na	Ne	D	He	PIC
HA 293	7	3	2,58	0,61	0,66	0,53
HA 749	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
HA 790	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21
HA 806	5	2	1,92	0,48	0,53	0,36
HA 911	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 920	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 928	7	4	3,27	0,69	0,75	0,64
HA 991	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 1287	5	5	5,00	0,80	0,89	0,77
HA 1402	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 1752	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
HA 1848	7	5	4,45	0,78	0,84	0,74
HA 2053	7	4	3,27	0,69	0,75	0,64
HA 2063	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 2077	7	4	2,58	0,61	0,66	0,57
HA 2078	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21
HA 2145	7	3	2,58	0,61	0,66	0,53
HA 2147	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50
HA 2178	7	3	2,88	0,65	0,70	0,58
HA 2191	7	4	2,58	0,61	0,66	0,57
HA 2193	7	3	1,81	0,45	0,48	0,41
HA 2265	5	4	3,57	0,72	0,80	0,67
HA 2448	6	3	3,00	0,67	0,73	0,59
HA 2499	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21
HA 2500	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
HA 2547	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50
HA 2579	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50
HA 2605	5	2	1,92	0,48	0,53	0,36
HA 2905	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 2920	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50
HA 2946	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50
HA 3070	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 3204	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 3239	7	3	2,58	0,61	0,66	0,53
HA 3272	7	4	3,27	0,69	0,75	0,64
HA 3288	6	3	2,57	0,61	0,67	0,54
HA 3298	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21

<b>Marcador</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>D</b>	<b>He</b>	<b>PIC</b>
HA 3312	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HA 3330	5	4	3,57	0,72	0,80	0,67
HA 3348	7	4	3,27	0,69	0,75	0,64
HA 3373	7	4	2,58	0,61	0,66	0,57
HA 3555	6	2	1,80	0,44	0,48	0,35
HA 3582	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21
HA 3627	7	3	2,88	0,65	0,70	0,58
HA 3632	7	5	4,45	0,78	0,84	0,74
HA 3703	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
HA 3886	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21
HA 4011	7	6	5,44	0,82	0,88	0,79
HA 4057	7	5	3,77	0,73	0,79	0,70
HA 4103	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
HA 4149	7	3	1,81	0,45	0,48	0,41
HA 4239	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21
HT 292	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HT 375	7	3	1,81	0,45	0,48	0,41
HT 382	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
HT 426	7	3	1,81	0,45	0,48	0,41
HT 440	7	4	3,27	0,69	0,75	0,64
HT 519	7	4	2,58	0,61	0,66	0,57
HT 586	7	3	2,58	0,61	0,66	0,53
HT 734	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HT 761	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
HT 974	6	2	1,80	0,44	0,48	0,35
HT 998	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
ORS 16	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50
ORS 229	7	3	2,58	0,61	0,66	0,53
ORS 297	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50
ORS 316	6	3	2,00	0,50	0,55	0,45
ORS 354	6	2	1,38	0,28	0,30	0,24
ORS 371	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
ORS 420	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21
ORS 457	7	3	2,58	0,61	0,66	0,53
ORS 460	6	5	4,50	0,78	0,85	0,74
ORS 483	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
ORS 510	7	3	2,58	0,61	0,66	0,53
ORS 561	6	2	1,80	0,44	0,48	0,35
ORS 613	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50

Marcador	N	Na	Ne	D	He	PIC
ORS 665	6	3	2,57	0,61	0,67	0,54
ORS 687	7	2	1,96	0,49	0,53	0,37
ORS 727	6	5	4,50	0,78	0,85	0,74
ORS 844	7	4	2,58	0,61	0,66	0,57
ORS 878	5	2	1,47	0,32	0,36	0,54
ORS 887	6	3	2,57	0,61	0,67	0,54
ORS 899	7	3	1,81	0,45	0,48	0,41
ORS 959	7	4	2,58	0,61	0,66	0,57
ORS 993	7	3	2,33	0,57	0,62	0,50
ORS 1024	7	4	3,27	0,69	0,75	0,64
ORS 1041	7	2	1,69	0,41	0,44	0,32
ORS 1146	7	2	1,32	0,24	0,26	0,21
ORS 1222	6	3	2,57	0,61	0,67	0,54
ORS 1247	6	2	1,38	0,28	0,30	0,24
ORS 1265	6	3	2,57	0,61	0,67	0,54
Promedio	6,71	2,88	2,34	0,52	0,56	0,46

**N:** número de individuos; **Na:** número promedio de alelos por *locus*; **Ne:** número efectivo promedio de alelos por *locus*; **D:** Índice de diversidad genética; **He:** Heterocigosidad Inssegada de Nei; **PIC:** Contenido de Información Polimórfica.

**Tabla 12:** Análisis de segregación de 34 marcadores en 70 individuos de la población F<sub>2</sub> B59xR432.

Marcador	$\chi^2_{1:2:1}$	<i>p</i>	Significancia
HA1402	5,16	0,07577	ns
HA1752	0,43	0,80712	ns
HA2063	2,22	0,32943	ns
HA2191	3,43	0,18026	ns
HA2193	0,36	0,83527	ns
HA2500	1,36	0,50759	ns
HA2547	0,46	0,79392	ns
HA2579	0,08	0,96130	ns
HA2905	234,00	0,00000	*****
HA2920	0,15	0,92596	ns
HA3373	1,26	0,53355	ns
HA3627	0,14	0,93106	ns
HA3632	2,08	0,35400	ns
HA3703	0,59	0,74489	ns
HA4057	1,38	0,50042	ns
HA911	1,26	0,53134	ns
HA920	112,56	0,00000	*****
HA928	1,97	0,37288	ns
HT292	1,81	0,40552	ns
HT519	4,17	0,12438	ns
HT586	0,37	0,83116	ns
ORS1024	0,12	0,94176	ns
ORS1265	0,87	0,64668	ns
ORS297	0,44	0,80252	ns
ORS316	11,26	0,00359	**
ORS354	2,92	0,23188	ns
ORS371	5,37	0,06828	ns
ORS457	0,75	0,68729	ns
ORS510	1,26	0,53266	ns
ORS561	1,08	0,58335	ns
ORS665	1,11	0,57503	ns
ORS687	2,08	0,35400	ns
ORS887	2,10	0,34949	ns
ORS959	1,29	0,52579	ns

$\chi^2_{1:2:1}$ : Chi Cuadrado; *p*: p-valor; **ns**: no significativo



**Tabla 13:** Análisis de segregación de 34 marcadores en 70 individuos de la población F<sub>2</sub> B59xR423.

Marcador	$\chi^2_{1:2:1}$	<i>p</i>	Significancia
HA1402	8,92	0,01156	*
HA1752	4,49	0,10575	ns
HA2053	18,53	0,00009	****
HA2077	1,97	0,37333	ns
HA2078	4,50	0,10540	ns
HA2145	0,60	0,74082	ns
HA2147	0,56	0,75516	ns
HA2178	20,55	0,00003	****
HA2191	3,95	0,13904	ns
HA2193	0,24	0,88548	ns
HA2448	1,89	0,38890	ns
HA2500	2,19	0,33468	ns
HA2579	0,49	0,78171	ns
HA2905	0,44	0,80252	ns
HA2920	0,89	0,64022	ns
HA293	1,63	0,44296	ns
HA3348	1,68	0,43080	ns
HA3373	2,78	0,24885	ns
HA3627	10,18	0,00615	**
HA4057	3,69	0,15836	ns
HA4103	3,19	0,20299	ns
HT375	1,63	0,44296	ns
HT382	0,26	0,87935	ns
HT440	3,23	0,19903	ns
HT519	1,97	0,37275	ns
HT586	2,31	0,31438	ns
ORS1024	2,49	0,28746	ns
ORS1041	6,33	0,04214	*
ORS16	4,53	0,10361	ns
ORS297	8,63	0,01336	*
ORS316	1,20	0,54802	ns
ORS371	6,15	0,04617	*
ORS510	0,49	0,78408	ns
ORS613	1,35	0,50881	ns

$\chi^2_{1:2:1}$ : Chi Cuadrado; *p*: p-valor; **ns**: no significativo

**Tabla 14:** Análisis de segregación de 34 marcadores en 70 individuos de la población F<sub>2</sub> R423xR419.

Marcador	$\chi^2_{1:2:1}$	<i>p</i>	Significancia
HA1752	228,00	0,00000	*****
HA2053	234,00	0,00000	*****
HA2077	231,00	0,00000	*****
HA2145	234,00	0,00000	*****
HA2193	234,00	0,00000	*****
HA2499	234,00	0,00000	*****
HA2547	234,00	0,00000	*****
HA2579	234,00	0,00000	*****
HA2605	234,00	0,00000	*****
HA2920	231,00	0,00000	*****
HA3204	216,00	0,00000	*****
HA3298	234,00	0,00000	*****
HA3632	234,00	0,00000	*****
HA3886	234,00	0,00000	*****
HA4011	234,00	0,00000	*****
HA4057	234,00	0,00000	*****
HA4239	231,00	0,00000	*****
HA749	234,00	0,00000	*****
HA911	231,00	0,00000	*****
HA920	219,00	0,00000	*****
HA991	234,00	0,00000	*****
HT440	231,00	0,00000	*****
HT761	234,00	0,00000	*****
HT974	234,00	0,00000	*****
ORS613	234,00	0,00000	*****
ORS1024	228,00	0,00000	*****
ORS297	231,00	0,00000	*****
ORS371	234,00	0,00000	*****
ORS460	234,00	0,00000	*****
ORS510	231,00	0,00000	*****
ORS665	228,00	0,00000	*****
ORS727	234,00	0,00000	*****
ORS899	234,00	0,00000	*****
ORS959	219,00	0,00000	*****

$\chi^2_{1:2:1}$ : Chi Cuadrado; *p*: p-valor.

**Tabla 15:** Análisis de segregación de 34 marcadores en 70 individuos de la población F<sub>2</sub> R419xR423.

Marcador	$\chi^2_{1:2:1}$	<i>p</i>	Significancia
HA1752	1,79	0,40872	ns
HA2053	2,68	0,26185	ns
HA2077	4,41	0,11007	ns
HA2145	5,84	0,05383	ns
HA2193	3,47	0,17662	ns
HA2499	0,55	0,76130	ns
HA2547	0,46	0,79392	ns
HA2579	3,44	0,17943	ns
HA2605	4,63	0,09893	ns
HA2920	2,30	0,31731	ns
HA3204	1,00	0,60653	ns
HA3298	0,67	0,71458	ns
HA3632	2,38	0,30408	ns
HA3886	1,99	0,37028	ns
HA4011	15,72	0,00039	***
HA4057	0,14	0,93106	ns
HA4239	3,70	0,15702	ns
HA749	1,89	0,38890	ns
HA911	0,33	0,84648	ns
HA920	1,35	0,50881	ns
HA991	5,36	0,06860	ns
HT440	0,04	0,97909	ns
HT761	104,77	0,00000	*****
HT974	110,11	0,00000	*****
ORS613	1,38	0,50042	ns
ORS1024	4,64	0,09809	ns
ORS297	13,15	0,00140	**
ORS371	1,34	0,51117	ns
ORS460	1,13	0,56791	ns
ORS510	4,10	0,12883	ns
ORS665	1,32	0,51685	ns
ORS727	0,32	0,85394	ns
ORS899	2,10	0,35066	ns
ORS959	116,29	0,00000	*****

$\chi^2_{1:2:1}$ : Chi Cuadrado; *p*: p-valor; **ns**: no significativo

**Tabla 16:** Análisis de segregación de 34 marcadores en 70 individuos de la población F<sub>2</sub> R419xR432.

Marcador	$\chi^2_{1:2:1}$	<i>p</i>	Significancia
HA1752	2,43	0,29692	ns
HA1848	0,08	0,96130	ns
HA2053	9,73	0,00770	**
HA2193	1,08	0,58407	ns
HA2499	1,53	0,46573	ns
HA2547	0,17	0,91786	ns
HA2579	213,00	0,00000	****
HA3348	3,47	0,17662	ns
HA3373	3,85	0,14606	ns
HA3555	94,31	0,00000	****
HA3627	1,97	0,37275	ns
HA3632	1,20	0,54881	ns
HA4011	1,26	0,53175	ns
HA4239	0,29	0,86525	ns
HA991	1,00	0,60653	ns
HT292	1,32	0,51618	ns
HT382	1,85	0,39616	ns
HT440	3,07	0,21593	ns
HT734	0,67	0,71653	ns
HT761	1,51	0,47071	ns
HT974	223,10	0,00000	****
ORS1024	0,84	0,65636	ns
ORS1041	1,22	0,54275	ns
ORS16	0,94	0,62411	ns
ORS297	1,99	0,37028	ns
ORS354	0,29	0,86525	ns
ORS371	2,84	0,24121	ns
ORS457	1,05	0,59098	ns
ORS460	0,95	0,62270	ns
ORS510	3,35	0,18762	ns
ORS561	0,84	0,65636	ns
ORS613	228,00	0,00000	****
ORS665	1,57	0,45579	ns
ORS887	5,73	0,05689	ns

$\chi^2_{1:2:1}$ : Chi Cuadrado; *p*: p-valor; **ns**: no significativo